



MAI SỸ TUẤN (Tổng Chủ biên) – ĐÌNH QUANG BÁO (Chủ biên)
PHAN DUỆ THANH - TRẦN THỊ THUYẾT - NGUYỄN THỊ HỒNG VÂN

CHUYÊN ĐỀ HỌC TẬP

Sinh học

10

BẢN MẪU



Đọc sách tại hoc10.vn

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

MAI SỸ TUẤN (Tổng Chủ biên) – ĐINH QUANG BẢO (Chủ biên)
PHAN DUỆ THANH – TRẦN THỊ THUYẾT – NGUYỄN THỊ HỒNG VÂN

CHUYÊN ĐỀ HỌC TẬP

Sinh học

10

BẢN MẪU

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC SƯ PHẠM



MỤC LỤC

NỘI DUNG		trang
HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG SÁCH		4
CHUYÊN ĐỀ 1: CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ MỘT SỐ THÀNH TỰU		6
1	Thành tựu hiện đại của công nghệ tế bào	6
2	Cơ sở công nghệ tế bào thực vật và ứng dụng	11
3	Các giai đoạn của công nghệ tế bào thực vật	15
4	Cơ sở công nghệ tế bào động vật và ứng dụng	24
5	Các giai đoạn của công nghệ tế bào động vật	29
6	Công nghệ tế bào gốc và ứng dụng	36
Ôn tập chuyên đề 1		44
CHUYÊN ĐỀ 2: CÔNG NGHỆ ENZYME VÀ ỨNG DỤNG		45
7	Cơ sở khoa học và một số thành tựu của công nghệ enzyme	45
8	Sản xuất enzyme tự nhiên	50
9	Sản xuất enzyme tái tổ hợp	56
10	Ứng dụng và triển vọng của công nghệ enzyme	60
Ôn tập chuyên đề 2		67
CHUYÊN ĐỀ 3: CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT TRONG XỬ LÝ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG		68
11	Khái quát về vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm môi trường	68
12	Công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm môi trường đất, nước	72
13	Công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong thu hồi khí sinh học và xử lý chất thải rắn	81
14	Dự án điều tra công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong xử lý rác thải hoặc nước thải	86
Ôn tập chuyên đề 3		88
BẢNG GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ		89



Hướng dẫn sử dụng sách

Các em học sinh yêu quý!

Sách **Chuyên đề học tập Sinh học 10** (bộ sách giáo khoa Cánh Diều) được biên soạn theo Chương trình giáo dục phổ thông 2018, tiếp nối sau sách giáo khoa Sinh học 10. Sách được biên soạn nhằm đáp ứng yêu cầu phát triển phẩm chất và năng lực của học sinh cấp trung học phổ thông, gồm 3 chuyên đề: **Công nghệ tế bào và một số thành tựu, Công nghệ enzyme và ứng dụng, Công nghệ vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm môi trường.**

Nội dung của các chuyên đề trong sách được phát triển từ chủ đề sinh học tế bào và vi sinh vật học. Trong đó, sinh học tế bào là cơ sở công nghệ tế bào và ứng dụng công nghệ enzyme; kiến thức vi sinh vật học là cơ sở khoa học cho công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong lĩnh vực xử lý ô nhiễm môi trường. Nội dung của chuyên đề định hướng cho các em lựa chọn ngành nghề trong bối cảnh phát triển của công nghệ sinh học và cuộc Cách mạng công nghiệp lần thứ tư.

Các bài học trong sách **Chuyên đề học tập Sinh học 10** sẽ giúp các em khám phá khoa học, phát triển năng lực nhận thức, trong đó chú ý tổ chức các hoạt động trải nghiệm, thực hành, ứng dụng và tìm hiểu các ngành nghề liên quan. Các em sẽ cảm thấy những bài học sinh học rất gần gũi và thú vị. Sách được trình bày hấp dẫn, diễn đạt một cách dễ hiểu; các hình ảnh sinh động, phong phú, nhiều màu sắc giúp cho các em hứng thú hơn trong học tập.

Các em hãy giữ cuốn sách sạch đẹp, không viết, vẽ vào sách.

Chúc các em hứng thú và học tập tốt hơn với cuốn sách này.



Trang đầu tiên của chuyên đề



Trang bài học



Trang bài dự án



Trang Ôn tập chuyên đề



Trang Bảng giải thích thuật ngữ

Học xong bài học này, em có thể

Đây là những yêu cầu mà các em cần đạt được sau mỗi bài học.

Các hoạt động học tập

Mở đầu



Hoạt động mở đầu giúp các em hướng tới những điều cần tìm hiểu trong bài học.

Hình thành kiến thức, kĩ năng

Quan sát, trả lời câu hỏi, thảo luận hoặc xử lí tình huống



Hoạt động này giúp các em hình thành kiến thức và kĩ năng theo mục tiêu bài học.



Thực hành

Thực hành là hoạt động của các em thực hiện thao tác lên đối tượng cần tìm hiểu của bài học. Đây là cách tốt nhất để các em khám phá thế giới sống và rèn luyện kĩ năng.

Luyện tập



Hoạt động luyện tập là hoạt động của các em vận dụng và hệ thống hoá những kiến thức, kĩ năng vừa được học, giúp hiểu sâu hơn kiến thức và thành thạo hơn các kĩ năng.

Vận dụng



Hoạt động vận dụng giúp các em vận dụng những kiến thức và kĩ năng đã học vào thực tiễn cuộc sống.

Mở rộng

Em có biết

Hoạt động này cung cấp thêm thông tin thú vị, liên quan đến tri thức của bài học, giúp các em mở rộng hiểu biết và hứng thú hơn trong học tập.

Tìm hiểu thêm

Hoạt động này giúp các em nhận thức thêm những điều mới, mở rộng nội dung bài học.

Kiến thức cốt lõi



Đây là những kiến thức, kĩ năng cốt lõi mà các em cần có được sau mỗi bài học.

Bài 1 THÀNH TỰU HIỆN ĐẠI CỦA CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

Học xong bài học này, em có thể:

- Kể được một số thành tựu hiện đại nổi bật của công nghệ tế bào.
- Phân tích được triển vọng của công nghệ tế bào trong tương lai.



- Đối với những loài thực vật có nguy cơ bị tuyệt chủng và khả năng tái sinh trong tự nhiên rất thấp, làm thế nào để duy trì và nhân nhanh số lượng cá thể của loài?
- Bằng cách nào có thể tạo được các mô da lành dùng cho điều trị các trường hợp bị bỏng và phải cấy ghép da?



Công nghệ tế bào được phát triển dựa trên những nguyên lý sinh học nào?

Công nghệ tế bào là một lĩnh vực thuộc công nghệ sinh học, bao gồm các quy trình kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào ở môi trường nuôi cấy trong ống nghiệm (*in vitro*) nhằm duy trì và tăng sinh tế bào, mô; từ đó sản xuất được sản phẩm theo yêu cầu của nhà sản xuất. Công nghệ tế bào được phát triển dựa trên các nguyên lý của sinh học tế bào, di truyền học phân tử,

kỹ thuật DNA và protein tái tổ hợp. Nền tảng của công nghệ tế bào là các kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào, kỹ thuật thao tác trên tế bào nuôi cấy như chuyển gene, chuyển nhân, gây đột biến, lai tế bào và tối ưu điều kiện nuôi cấy để sản xuất các sản phẩm mong muốn. Hai hướng phát triển chính của công nghệ tế bào là công nghệ tế bào thực vật và công nghệ tế bào động vật, với những đặc thù về mẫu sinh học, môi trường nuôi cấy và các kỹ thuật nuôi cấy, cùng với các sản phẩm công nghệ. Bên cạnh đó, công nghệ tế bào gốc là một lĩnh vực có tiềm năng ứng dụng quan trọng được phát triển mạnh mẽ trong những năm gần đây.

I. THÀNH TỰU HIỆN ĐẠI VÀ TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

Công nghệ tế bào hình thành từ cuối thế kỷ XIX, khởi đầu từ kỹ thuật nuôi tế bào thực vật *in vitro* của Gottlieb Haberlandt vào năm 1902 và phát hiện khả năng nuôi cấy tế bào động vật trong môi trường nhân tạo của Ross Harrison năm 1907. Trải qua quá trình hình thành và phát triển, cho đến nay, công nghệ tế bào đã đạt được nhiều thành tựu và đóng góp quan trọng cho khoa học và đời sống.

Công nghệ tế bào thực vật hiện đại phát triển theo hướng sản xuất các dòng tế bào, mô và cơ quan nhân tạo; thao tác gene trên mô tế bào nuôi cấy (chuyển gene, gây đột biến); sản xuất các sản phẩm từ nuôi cấy mô tế bào thực vật (enzyme, chất chuyển hoá thứ cấp) và nhân giống vô tính cây trồng (vi nhân giống).

1. Một số thành tựu hiện đại của công nghệ tế bào thực vật

Phát triển các kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật

Trong thập niên 50 của thế kỉ XX, nhiều kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào đã ra đời và phát triển như tạo mô sẹo từ các tế bào đơn trong môi trường nuôi cấy; điều chỉnh tỉ lệ auxin/cytokinin để nuôi cấy tạo cơ quan; tái tạo phôi soma *in vitro* từ nhân noãn của cây thuộc chi Cam quýt (*Citrus*).

Tạo giống bằng lai tế bào và chuyển gene

Sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ tế bào thực vật trong giai đoạn cuối thế kỉ XX được đánh dấu với nhiều thành tựu về các công nghệ nuôi cấy tế bào, lai tế bào và chuyển gene vào tế bào nuôi cấy. Việc tạo cây lai khác loài từ lai tế bào trần, chuyển gene vào mô và tế bào thực vật nuôi cấy là các kĩ thuật trong công nghệ sinh học nông nghiệp sử dụng nguyên liệu của công nghệ tế bào. Một ví dụ là dòng ngô chuyển gene có tính kháng độc tố T của nấm *Helminthosporium maydis* gây bệnh đốm

ở ngô được tạo thành nhờ chuyển gene vào mô sẹo. Với sự kết hợp của công nghệ tế bào và công nghệ gene, nhiều giống cây trồng mới với năng suất được cải tiến (hình 1.1), có tính kháng bệnh và tính chống chịu điều kiện bất lợi. Đến nay, hàng ngàn hecta cây trồng chuyển gene nhờ ứng dụng công nghệ tế bào đã có ở hơn 40 quốc gia trên thế giới.

Bảo tồn nguồn gene thực vật

Công nghệ tế bào thực vật là một công cụ được sử dụng trong nhân giống cây trồng quý hiếm và cần được bảo tồn. Chỉ từ một phần của cơ thể các cây trồng này, công nghệ tế bào đã giúp tái sinh cây, tạo số lượng lớn cá thể của các loài thực vật có nguy cơ tuyệt chủng hoặc thuộc nhóm nguy cấp, cần được bảo tồn. Các cây được liệu quý đã được được bảo tồn như lan kim tuyến, sâm ngọc linh,... nhờ kĩ thuật nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào tại Việt Nam.

2. Triển vọng của công nghệ tế bào thực vật

Bên cạnh nhiều thành tựu đạt được, triển vọng hiện nay của công nghệ tế bào thực vật là sự kết hợp kĩ thuật chỉnh sửa gene trên tế bào thực vật nuôi cấy như mô sẹo. Nhờ đó, các nhà nghiên cứu khắc phục được tình trạng không thể chuyển gene ở một số cây trồng theo phương pháp thông thường như chuyển gene thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*. Bên cạnh những thành tựu trong cải tiến giống cây trồng, trong những năm gần đây, phát triển công nghệ tế bào trong bảo quản lạnh, nuôi cấy mô tế bào để sản xuất thuốc, các enzyme và vaccine ăn được là các hướng ứng dụng đầy tiềm năng.



Em có biết những cây trồng nào được cải tiến bằng kĩ thuật chuyển gene và nhân giống *in vitro* bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật? Hãy tìm hiểu về vai trò kinh tế của các cây trồng đó.



Hình 1.1. Ngô lai chuyển gene được trồng trên đồng ruộng

Em có biết

Cây lan kim tuyến (còn gọi là lan gấm) (tên khoa học là *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. (hình 1.2) thuộc họ Lan (Orchidaceae) là một loài thực vật bản địa và quý hiếm của Việt Nam, phân bố ở vùng núi một số tỉnh miền núi Bắc Bộ, Trung Bộ và Tây Nguyên. Đây là dược liệu vừa có giá trị khoa học, vừa có giá trị kinh tế cao. Do có công dụng chữa bệnh và tốt cho sức khỏe con người, loài cây này bị khai thác nhiều. Theo Sách Đỏ Việt Nam 2007, loài này được phân hạng ở mức nguy cấp. Các nhà khoa học Việt Nam đã nhân giống *in vitro* thành công cây thuốc này bằng quy trình kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật. Công nghệ tế bào thực vật đã góp phần tạo ra sự chủ động về nguồn giống để chuyên canh phục vụ sản xuất và bảo chế dược liệu.



Hình 1.2. Cây lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.)



Các thành tựu của công nghệ tế bào động vật có đóng góp đối với các lĩnh vực nào cho đời sống của con người?



Hình 1.3. Chuột nhắt trắng chuyển gene được sử dụng trong nghiên cứu

II. MỘT SỐ THÀNH TỰU HIỆN ĐẠI VÀ TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT

1. Một số thành tựu của công nghệ tế bào động vật

Phát triển các kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào động vật

Nhiều kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào động vật được phát triển như vi tiêm nhân, chuyển nhân, tạo dòng tế bào lai giữa tế bào người và tế bào chuột, tạo dòng tế bào, nuôi cấy mô, tái tạo cơ quan, ... Các kĩ thuật này hiện được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu và sản xuất các sản phẩm của công nghệ tế bào động vật. Năm 1996, cừu Dolly ra đời được coi là sản phẩm của công nghệ tế bào, đánh dấu mốc về sự ra đời sản phẩm nhân bản vô tính đầu tiên ở động vật có vú.

Chuyển gene vào tế bào động vật

Việc chuyển gene ngoại lai vào động vật được thực hiện nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp, sử dụng tế bào phôi và nuôi cấy tế bào để tạo động vật chuyển gene. Trong những năm 1970, chuột chuyển gene được tạo thành bằng việc kết hợp các tế bào phôi thuộc hai dòng chuột khác nhau, tạo ra phôi đơn và được nuôi cấy để phát triển thành dạng trưởng thành (Ralph Brinster, 1974). Chuột chuyển gene (hình 1.3) là động vật được tạo thành bằng công nghệ gene và công nghệ nuôi cấy tế bào. Cuối thế kỉ XX, các kĩ thuật dung hợp tế bào và chuyển gene được phát triển để sản xuất kháng thể đơn dòng, đa dòng sử dụng tế bào nuôi cấy. Những đóng góp của công nghệ tế bào kết hợp với công nghệ gene đã cho phép tạo động vật chuyển gene, ứng dụng trong nghiên cứu và sản xuất sản phẩm phục vụ đời sống.

Sự ra đời của công nghệ tế bào gốc

Từ những năm 1990, phát triển công nghệ tế bào gốc là thành tựu nổi bật của công nghệ tế bào động vật. Từ những năm 1990, một trong các thành tựu nổi bật của công nghệ tế bào động vật là sự phát triển công nghệ tế bào gốc. Có thể kể đến một số công trình đánh dấu mốc quan trọng trong lĩnh vực này là: nuôi cấy tạo mô và tế bào gốc thần kinh của người trong điều kiện in vitro vào năm 1992 của Skin Ethic; phân lập và nuôi cấy tế bào gốc phôi thai trong nghiên cứu của James Thomson và John Gearhart năm 1998; tế bào gốc vạn năng cảm ứng (iPSC) đầu tiên được tạo thành bởi Shinya Yamanaka vào năm 2006.

Sản xuất sản phẩm từ nuôi cấy mô tế bào động vật

Ngày nay, nuôi cấy mô tế bào động vật có vú là giai đoạn thiết yếu trong sản xuất các thuốc như thuốc chống ung thư, các chất tạo miễn dịch (interleukin, lymphokine, kháng thể đơn dòng và hormone), yếu tố đông máu, vaccine,... Các thuốc này có thể được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp trên các dòng tế bào động vật nuôi cấy, được sử dụng trong điều trị các bệnh tim mạch, bệnh thiếu máu, bệnh máu khó đông, bệnh truyền nhiễm và bệnh lùn bẩm sinh.

Bảo tồn nguồn gene động vật

Nhiều dòng tế bào nuôi cấy bắt nguồn từ mẫu sinh học của các loài trong danh mục thuộc Công ước về thương mại quốc tế các loài động vật và thực vật hoang dã nguy cấp (CITES). Trong đó có dòng tế bào vero (tế bào thận của khỉ xanh châu Phi); các dòng tế bào có nguồn gốc từ linh trưởng bậc cao như Gorilla (EB(JC)), đười ươi (EB185(JC)) được sử dụng để nghiên cứu về virus HIV. Các nhà khoa học sử dụng các dòng tế bào nuôi cấy để hạn chế việc khai thác động vật quý hiếm, nguy cấp cần bảo tồn khi vẫn cần mẫu sinh học cho mục đích nghiên cứu. Công nghệ tế bào gốc là công cụ tiềm năng để sử dụng trong bảo tồn các loài động vật có nguy cơ tuyệt chủng và phục hồi các loài đã tuyệt chủng thông qua các dòng tế bào nuôi cấy. Bên cạnh đó, các nghiên cứu tập trung theo hướng ứng dụng để bảo tồn động vật, nuôi cấy mô tế bào trong phòng thí nghiệm có thể sản xuất thịt, da và lông. Do vậy, công nghệ tế bào động vật góp phần bảo tồn đa dạng sinh học.



Hình 1.4. Kháng thể đơn dòng được sử dụng trong hỗ trợ điều trị COVID-19 do nhiễm SARS-CoV-2

2. Triển vọng của công nghệ tế bào động vật

In sinh học 3D là ứng dụng kỹ thuật số để chế tạo các mô và cơ quan mô phỏng chính xác các đặc điểm của mô tự nhiên từ vật liệu có sẵn. Trong những năm gần đây, các kỹ thuật tạo mô và cơ quan bằng in sinh học 3D phát triển, cung cấp nguồn mô lành để cấy ghép tạng và là cơ sở để phát triển y học tái tạo. Một số sản phẩm của công nghệ in sinh học 3D tiêu biểu là mô da, mô tim, mạch máu được tạo thành cung cấp nguồn mô cho điều trị phẫu thuật và cấy ghép. Trong thời gian tới, nuôi cấy tế bào 3D và in sinh học vẫn là một hướng phát triển đầy triển vọng. Các nghiên cứu tiếp tục theo hướng tìm kiếm vật liệu, cho phép lắp ráp các tế bào để tái tạo mô, cơ quan tạo mạch máu một cách chính xác. Bên cạnh đó, những tiến bộ liên tục của công nghệ tế bào gốc giúp đưa thực nghiệm *in vitro* đến gần hơn với các quá trình sống trong cơ thể.

Những thành tựu to lớn của công nghệ tế bào khẳng định vai trò của lĩnh vực này trong nghiên cứu khoa học và sản xuất, tạo nên các giá trị kinh tế, thương mại và đặc biệt có tác động lớn đến lĩnh vực chăm sóc sức khỏe con người.



Hãy kể một số thành tựu hiện đại nổi bật của công nghệ tế bào thực vật và động vật.
Nêu triển vọng của công nghệ tế bào trong tương lai.



1. Hãy đánh giá những tác động tích cực của công nghệ tế bào đối với khoa học và đời sống.
2. Theo em, công nghệ tế bào có tác động tiêu cực đối với thế giới tự nhiên và con người không? Hãy nêu những dẫn chứng minh họa cho nhận định của em.
3. Hãy tìm hiểu về sự phát triển của công nghệ tế bào ở Việt Nam. Kể một số ứng dụng công nghệ tế bào và vai trò của chúng đối với đời sống của con người tại địa phương nơi em sống.



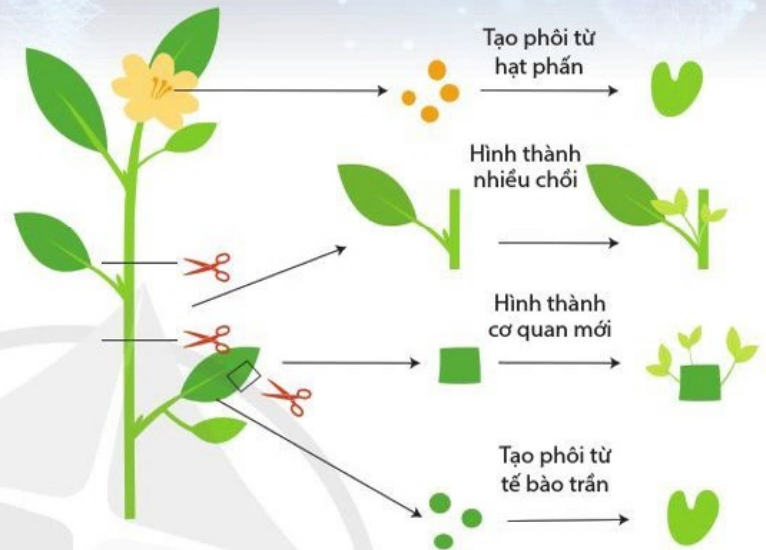
- Công nghệ tế bào có vai trò không chỉ là công cụ trong nghiên cứu khoa học mà còn là công nghệ ứng dụng sản xuất nhiều sản phẩm quan trọng phục vụ đời sống con người.
- Hai hướng nghiên cứu và ứng dụng của công nghệ tế bào là công nghệ tế bào thực vật và công nghệ tế bào động vật.
- Một số thành tựu của công nghệ tế bào nổi bật là sự phát triển công nghệ nuôi cấy mô tế bào, sản xuất các sản phẩm nhờ quá trình nuôi cấy, đóng góp trong bảo tồn nguồn gene, vi nhân giống cây trồng và sự phát triển công nghệ tế bào gốc.
- Trong tương lai, công nghệ tế bào là lĩnh vực đầy triển vọng khi kết hợp giữa phát triển các kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào, tái tạo mô và cơ quan, công nghệ tế bào gốc kết hợp với các kỹ thuật di truyền, tạo ra nhiều sản phẩm mang lại giá trị kinh tế và phục vụ đời sống của con người.

Học xong bài học này, em có thể:

- Trình bày được tính toàn năng của tế bào.
- Kể được các ví dụ về ứng dụng của công nghệ tế bào thực vật.



Hãy quan sát hình 2.1 và cho biết, người ta có thể nhân giống vô tính để tạo cây con từ cây trưởng thành bằng những cách nào? Công nghệ nào có thể cho phép nhân nhanh hàng loạt cây trồng mới từ một phần của lá cây hoặc chồi cây?



Hình 2.1. Các hướng tiến hành tái sinh mô tế bào thực vật

I. TÍNH TOÀN NĂNG CỦA TẾ BÀO

Tế bào là đơn vị cấu tạo nên mỗi cơ thể sống. Mỗi tế bào đều chứa hệ gene - bộ máy di truyền chi phối mọi hoạt động sống cơ bản, khả năng phân chia của tế bào và khả năng tế bào phát triển thành cơ thể hoàn chỉnh.

Năm 1902, nhà sinh lí học thực vật Gottlieb Haberlandt đã đưa ra nhận định rằng, mỗi tế bào thực vật có tiềm năng phát triển thành một cây hoàn chỉnh. Sau đó, khái niệm tính toàn năng của tế bào thực vật được Gottlieb Haberlandt đề xuất dựa trên cơ sở học thuyết tế bào của Matthias Schleiden và Theodor Schwann. Bằng chứng thực nghiệm của Frederick Steward (1958) đã chứng minh rằng các đoạn mô dẫn của cây cà rốt có thể tái sinh toàn bộ cây hoàn chỉnh. Trên cơ sở đó, thuật ngữ “tính toàn năng” (totipotency) của tế bào soma thực vật đã chính thức ra đời vào năm 1968.

Tính toàn năng của tế bào là khả năng tế bào trải qua các giai đoạn phát triển, tái sinh tạo các mô, cơ quan hoặc một cơ thể hoàn chỉnh trong môi trường thích hợp. Ở thực vật, tế bào phôi là những tế bào có tính toàn năng ở mức cao nhất và được gọi là các tế bào gốc thực vật.



Thế nào là tính toàn năng của tế bào? Ở thực vật, tính toàn năng của tế bào được thể hiện thông qua khả năng tái sinh mô, cơ quan và cơ thể như thế nào? Nêu ví dụ minh họa.

Tìm hiểu thêm

Tính toàn năng và tính mềm dẻo phát triển của thực vật mở ra tiềm năng nào cho nhân giống cây trồng?

Khả năng tái sinh là khả năng phát triển thành cơ thể mới và phản ánh tính “mềm dẻo phát triển” của tế bào, mô hoặc cơ quan của cơ thể. So với động vật, nhìn chung thực vật có mức mềm dẻo phát triển cao hơn. Trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, khả năng tái sinh của thực vật được tăng cường nhờ bổ sung và điều chỉnh lượng hormone thực vật ngoại sinh, trong đó tỉ lệ giữa auxin và cytokinin quyết định hướng phát triển của các cơ quan được tái sinh. Ở một số thực vật, sự tái sinh có thể xảy ra nhờ phân biệt hoá (tái lập trình các tế bào soma đã biệt hoá hoặc hoạt hoá quá trình tái sinh ở các tế bào chưa được biệt hoá của mô soma).

II. KHÁI QUÁT VỀ CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

Công nghệ tế bào thực vật bao gồm các quy trình kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật và các kỹ thuật thao tác trên tế bào, mô thực vật nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* để sản xuất các sản phẩm phục vụ đời sống.

Nuôi cấy mô tế bào thực vật, thao tác trên tế bào và mô thực vật nuôi cấy là các kỹ thuật cốt lõi trong công nghệ tế bào thực vật. Khi môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật *in vitro* chứa đầy đủ các thành phần dinh dưỡng, bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng và phát triển, các tế bào, mô và cơ quan của thực vật sẽ duy trì, tăng sinh và tái tạo cây con.



Vi nhân giống có lợi ích vượt trội như thế nào so với các phương pháp nhân giống cây trồng truyền thống (nhân giống và trồng cây ngoài đồng ruộng)?

Sản phẩm của công nghệ tế bào thực vật đa dạng, đáp ứng được nhiều mục tiêu khác nhau, chẳng hạn, nhân giống vô tính bằng nuôi cấy mô tế bào trong điều kiện *in vitro* (vi nhân giống) hoặc sản xuất các sản phẩm trao đổi chất từ nuôi cấy mô, tế bào. Công nghệ tế bào thực vật không chỉ được ứng dụng trong thực tiễn sản xuất mà còn là công cụ nghiên cứu sinh học.

III. ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

1. Ứng dụng trong chọn tạo giống cây trồng

Sự kết hợp công nghệ tế bào thực vật với các kỹ thuật sinh học phân tử (như chuyển gene vào mảnh mô, tế bào) đã và đang được ứng dụng trong cải tiến giống cây trồng, tạo nên những giống cây có những đặc tính nông học quan trọng như kháng côn trùng, kháng bệnh. Sử dụng các chỉ thị phân tử và nuôi cấy tế bào được áp dụng trong chọn giống cây trồng.

Công nghệ vi nhân giống *in vitro* hiện nay được ứng dụng trong sản xuất cây sạch bệnh, nhân nhanh cây có kiểu gene quý hiếm, tạo giống cây trồng mới. Các dòng cây đồng hợp tử (thuần chủng) được tạo thành qua các dạng song đơn bội (lưỡng bội hoá thể đơn bội) làm giảm thời gian cần thiết cho phát triển các giống cây trồng mới. Nhờ đó, công nghệ tế bào thực vật góp phần



Hình 2.2. Nhân giống vô tính cây chuối *in vitro*

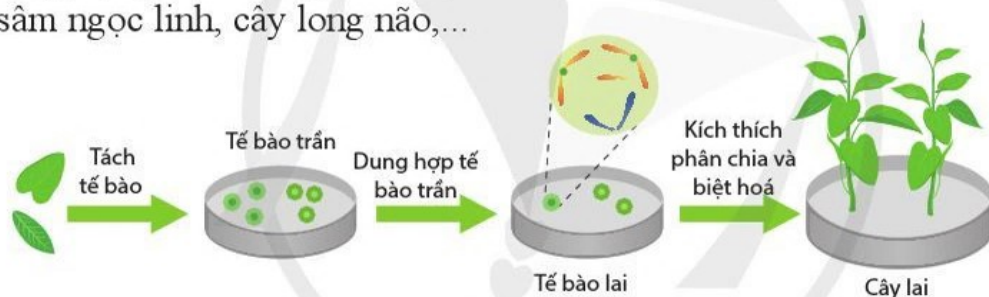
gia tăng số lượng các giống cây trồng mới ở các cây ngũ cốc, hoà thảo, cây họ Đậu, cây lấy dầu, cây ăn quả nhiệt đới, cây lâm nghiệp,... Công nghệ bảo quản lạnh đóng góp vào việc dự trữ phôi mầm và phát triển công nghệ hạt nhân tạo. Nuôi cấy mô tế bào và nhân giống vô tính *in vitro* còn được ứng dụng nhằm bảo tồn nguồn gene trong các chương trình bảo tồn giống cây trồng.



Vì sao sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thuận lợi hơn so với sử dụng cơ thể sống trong nghiên cứu tạo đột biến, lai khác loài, đa bội hoá?

2. Ứng dụng trong nghiên cứu sinh học

Công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật đã và đang đóng vai trò là công cụ nghiên cứu các lĩnh vực cơ bản của sinh học như thực vật học, hoá sinh học, di truyền học phân tử và công nghệ sinh học trong nông nghiệp. Dựa trên nuôi cấy mô tế bào thực vật, những nghiên cứu về phân tích bộ nhiễm sắc thể, nghiên cứu đột biến được thực hiện dễ dàng hơn (hình 2.3). Các nghiên cứu mối quan hệ giữa vật chủ và tác nhân gây bệnh, chẳng hạn vi khuẩn gây khối u, vật kí sinh ở thực vật, ... được áp dụng trên mẫu mô tế bào nuôi cấy. Nhờ đó, nhiều cơ chế ở mức độ phân tử về sự phát sinh hình thái, các con đường hoá sinh tổng hợp các chất và đặc tính di truyền ở cây trồng đã được làm sáng tỏ. Nuôi cấy tế bào, nuôi cấy mảnh mô, tái sinh cây là các kỹ thuật công nghệ tế bào thực vật được các nhà khoa học Việt Nam sử dụng trong nghiên cứu tạo cây chuyển gene ở cây thuốc lá, đậu tương, ...; nghiên cứu quá trình phát sinh cơ quan như chồi, rễ ở các cây dược liệu quý như sâm ngọc linh, cây long não, ...



Hình 2.3. Nuôi cấy và dung hợp tế bào trần trong nghiên cứu di truyền học thực vật

3. Ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm chuyển hoá

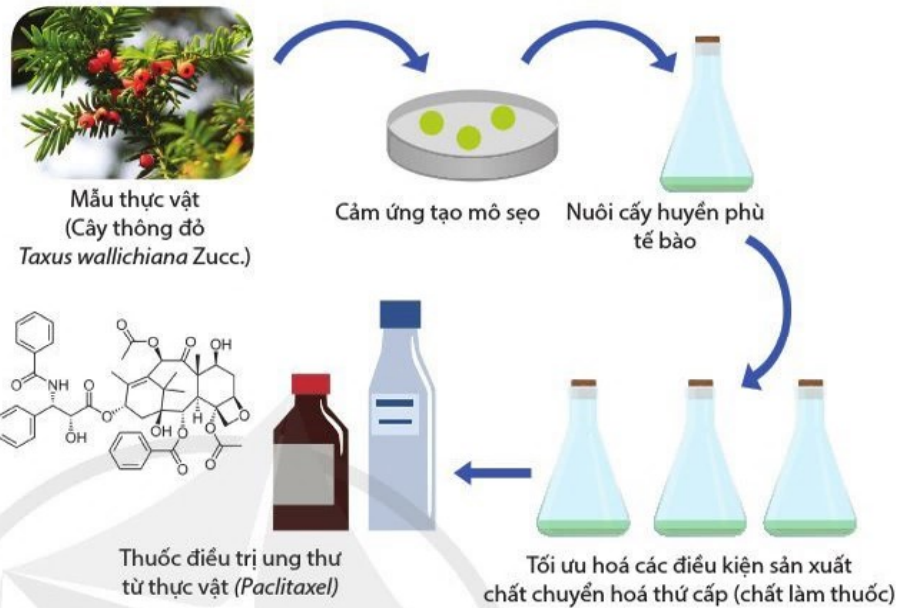
Để sản xuất protein tái tổ hợp từ tế bào thực vật, các dòng tế bào, mô nuôi cấy được sử dụng làm nguồn tế bào nhận gene ngoại lai. Nhiều protein được sản xuất bằng kỹ thuật này, như vaccine, cytokine và các protein trị liệu. Sản xuất thuốc và các sản phẩm từ công nghệ DNA tái tổ hợp kết hợp nuôi cấy mô tế bào được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như y học, công nghệ thực phẩm.

Ngoài ra, nhiều chất chuyển hoá thứ cấp được tổng hợp trong các tế bào thực vật có hoạt tính sinh dược học quan trọng. Một số chất chuyển hoá thứ cấp thuộc nhóm alkaloid, anthocyanin, terpenoid chỉ có thể được sản xuất ở tế bào thực vật. Để sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học, cần nguồn vật liệu lớn từ thực vật tự nhiên. Vì nhân giống thực vật hoặc các cơ quan từ thực vật (thường là rễ) hoặc mô sẹo có thể cung cấp nguyên liệu sản xuất chất chuyển hoá thứ cấp. Công nghệ này giúp hạn chế được việc khai thác quá mức các cây hoang dại. Sử dụng tế bào thực vật nuôi cấy để chuyển gene có ưu điểm vượt trội so với sử dụng tế bào động vật hoặc vi sinh vật do có thể tránh được sự lây nhiễm virus và các tác nhân gây bệnh khác.

Tim hiểu thêm

1. Hãy tìm thông tin về một số giống cây trồng được tạo ra nhờ kĩ thuật vi nhân giống ở Việt Nam và trên thế giới.
2. Em có biết về vaccine ăn được không? Hãy tìm hiểu về sản xuất vaccine ăn được bằng công nghệ tế bào thực vật.

Bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật, các thuốc có nguồn gốc từ thực vật, như Paclitaxel (hình 2.4), có thể được sản xuất ở dạng tinh khiết, với lượng lớn. Dịch chiết tế bào gốc thực vật dễ dàng được chuẩn hoá và đáp ứng các yêu cầu an toàn nghiêm ngặt trong quá trình sản xuất dược phẩm, mỹ phẩm.



Hình 2.4. Quy trình sản xuất thuốc Paclitaxel có nguồn gốc từ cây thông đỏ bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật

Tuy nhiên, nuôi cấy tế bào thực vật để sản xuất các hoạt chất thường có chi phí cao và hiệu suất thấp, do đó cần được đánh giá hiệu quả kinh tế khi sử dụng. Ngoài ra, trở ngại khác là tính bất ổn định về gene trong quá trình nuôi cấy có thể làm thay đổi hoặc giảm hiệu quả sản xuất các sản phẩm.



1. Vì sao không thể áp dụng công nghệ tế bào động vật hay công nghệ vi sinh vật để sản xuất một số chất chuyển hoá thứ cấp có hoạt tính sinh học nhất định?
2. Vì sao nuôi cấy tế bào gốc thực vật được ứng dụng trong sản xuất dược phẩm và mỹ phẩm?



1. Vì những lí do nào mà việc sử dụng mô tế bào thực vật thuận lợi hơn so với sử dụng tế bào vi khuẩn và tế bào động vật trong công nghệ sản xuất các chất chuyển hoá thứ cấp và protein trị liệu được ứng dụng trong việc điều trị bệnh ở người?
2. Tại sao công nghệ tế bào thường được phối hợp với công nghệ gene trong quy trình nghiên cứu, sản xuất các dược phẩm có bản chất là protein?
3. Tìm hiểu một số sản phẩm sinh dược được sản xuất nhờ công nghệ tế bào thực vật.



- Tính toàn năng của tế bào là khả năng tế bào có thể trải qua các giai đoạn phát triển, tái tạo thành các mô, cơ quan hoặc tạo nên một cơ thể hoàn chỉnh.
- Công nghệ tế bào thực vật bao gồm các quy trình kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật và các kĩ thuật thao tác trên tế bào, mô nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* để sản xuất các sản phẩm phục vụ đời sống.
- Công nghệ tế bào thực vật được ứng dụng trong nhân nhanh giống cây trồng; tạo giống cây trồng mới; tổng hợp các chất chuyển hoá thứ cấp nhằm sản xuất dược phẩm, mỹ phẩm, thực phẩm. Công nghệ tế bào còn là công cụ hữu hiệu cho nghiên cứu các quá trình sinh học.

Bài 3 CÁC GIAI ĐOẠN CỦA CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

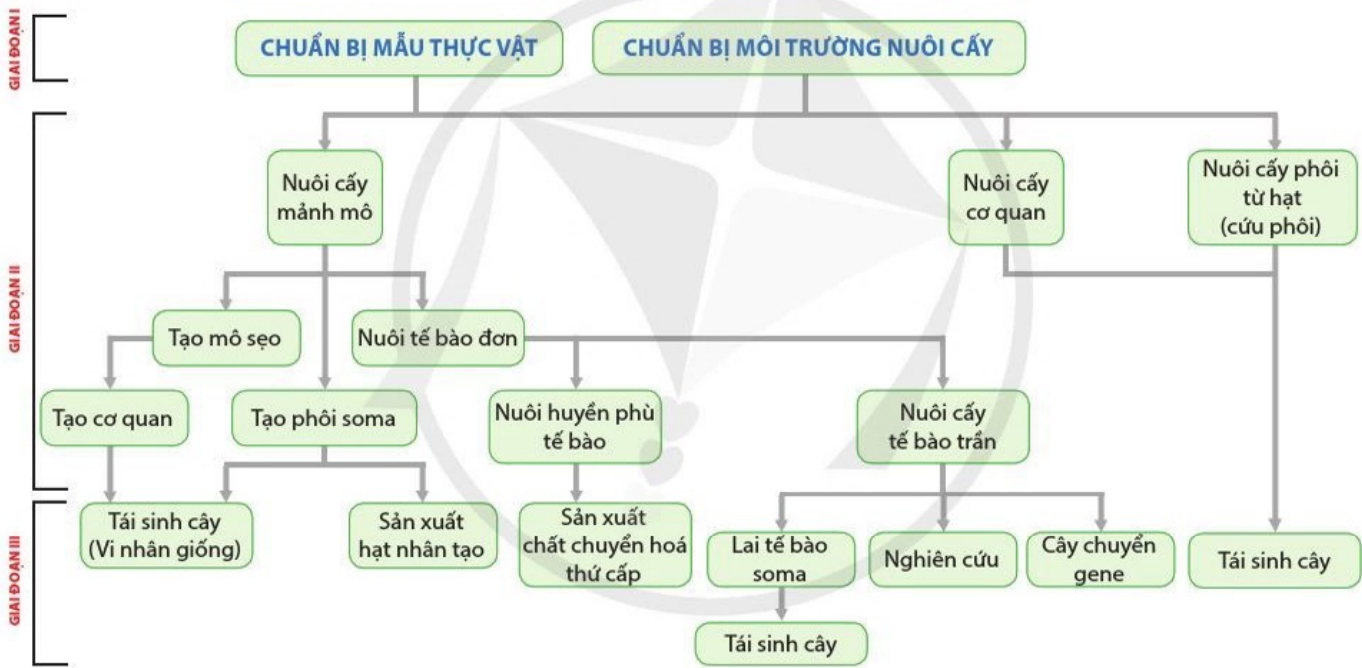
Học xong bài học này, em có thể:

- Trình bày được các giai đoạn của công nghệ tế bào thực vật.
- Thực hiện được dự án tìm hiểu về thành tựu nuôi cấy mô tế bào thực vật.



- Để trồng hàng loạt cây sắn (cây khoai mì) hoặc cây khoai lang, em có thể cắt một đoạn thân và trồng xuống đất. Vì sao có thể nhân giống cây trồng bằng phương pháp này?
- Các nhà khoa học đã nhân giống vô tính nhiều loài cây trồng quý bằng công nghệ tế bào thực vật, tiêu biểu là nhân giống lan kim tuyến (như đã nêu ở Bài 1). Em hãy phác thảo các giai đoạn công nghệ nhằm nhân giống lan kim tuyến.

I. CÁC GIAI ĐOẠN CỦA CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT



Hình 3.1. Sơ đồ các giai đoạn công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật



Quan sát hình 3.1, hãy cho biết công nghệ tế bào thực vật có các giai đoạn nào?

1. Giai đoạn chuẩn bị mẫu và môi trường nuôi cấy

1.1. Chuẩn bị mẫu nuôi cấy

Bước đầu tiên là chọn lọc nguồn vật liệu thích hợp và tiền xử lí mẫu để tiến hành nuôi cấy. Mẫu nuôi cấy là một phần mô hoặc cơ quan từ cây sạch bệnh, không nhiễm vi sinh vật kí sinh và côn trùng. Mẫu mô nuôi cấy có thể là một mảnh lá, lá mầm, rễ, đỉnh chồi, chồi nách hoặc phôi từ hạt.



1. Tại sao việc khử trùng mẫu trước khi nuôi cấy là cần thiết khi tiến hành nuôi cấy mô tế bào thực vật?
2. Tại sao có thể chọn các mẫu mô như mô mảnh lá, lá mầm, rễ, chồi đỉnh, chồi nách, phôi từ hạt để làm vật liệu nuôi cấy *in vitro*?

Tim hiểu thêm

Khử trùng mẫu mô tế bào nuôi cấy và khử trùng dụng cụ, thiết bị, môi trường có áp dụng cùng một phương pháp không? Vì sao?



1. Tại sao không thể áp dụng một phương pháp nuôi cấy chung trong giai đoạn nuôi cấy mô tế bào thực vật?
2. Các phương pháp nuôi cấy được xây dựng dựa trên những cơ sở nào?

Tiến hành khử trùng mẫu thực vật và khử trùng bề mặt thao tác với các dung dịch như sodium hypochloride, chất tẩy, hoặc ethanol (70 %) và rửa lại bằng nước cất vô trùng để loại hết hoá chất. Tuổi và trạng thái sinh lí của cây cho mô nuôi cấy là những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tái sinh cây.

1.2. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy chứa các chất dinh dưỡng và bổ sung các thành phần phù hợp (như hormone thực vật) để mô tế bào sinh trưởng và biệt hoá.

Có nhiều loại môi trường với công thức khác nhau dùng cho việc nuôi cấy mô thực vật, thường được sử dụng là môi trường MS (Murashige và Skoog), môi trường Gamborg. Môi trường nuôi cấy chứa các nguyên tố đa lượng, vi lượng, vitamin, đường sucrose và các chất khác (như nước dừa), có thể bổ sung kháng sinh và hormone thực vật phù hợp theo từng giai đoạn. Độ pH của môi trường khoảng 5,5 – 6,0 và có thể điều chỉnh tùy loài thực vật. Môi trường nuôi cấy được lựa chọn phù hợp với từng loài thực vật, loại mô và thường phải được nghiên cứu thử nghiệm bằng thay đổi thông số về nồng độ, thành phần các chất trong môi trường.

Môi trường nuôi cấy và các dụng cụ, thiết bị sử dụng cho nuôi cấy phải được khử trùng trước khi tiến hành nuôi cấy mô tế bào. Thông thường, khử trùng được thực hiện trong các thiết bị như nồi hấp khử trùng.

2. Giai đoạn nuôi cấy

Dựa vào mục đích nuôi cấy khác nhau như nhân giống, sản xuất sản phẩm thứ cấp, mẫu nuôi cấy khác nhau như mảnh mô, cơ quan, phôi, hạt, ..., các kĩ thuật và quy mô nuôi cấy được lựa chọn áp dụng một cách phù hợp. Dưới đây là một số kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào thường được áp dụng.

2.1. Nuôi cấy mảnh mô

Đây là kĩ thuật nuôi cấy có vai trò như một bước khởi đầu, trên cơ sở đó tiếp tục các kĩ thuật khác như nuôi cấy tạo mô sẹo, tái sinh cơ quan hoặc nuôi cấy mảnh mô để làm vật liệu chuyển gene thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Mẫu mảnh mô sau khi được cắt nhỏ, khử trùng sẽ được đặt vào môi trường nuôi cấy. Sau một thời gian, các tế bào đầu tiên di cư khỏi mô và bám vào bề mặt đĩa, tăng trưởng số lượng và tiếp tục được duy trì hoặc chuyển sang các điều kiện môi trường khác phù hợp với mục đích nuôi cấy.

2.2. Nuôi cấy mô sẹo

Mô sẹo (callus) là khối lộn xộn các tế bào “không có tổ chức”, không được biệt hoá, có thể đạt được tính toàn năng. Mô sẹo thường được tạo thành từ mảnh mô đã biệt hoá và được khử biệt hoá trong điều kiện *in vitro* (hình 3.2). Mô sẹo được cảm ứng để biệt hoá trở lại nếu môi trường nuôi cấy được bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng, tạo thành mô, cơ quan và cây hoàn chỉnh. Ngoài ra, mô sẹo còn là nguyên liệu để tạo sinh khối huyền phù tế bào và chuyển gene vào tế bào mô sẹo.



Hình 3.2. Mô sẹo hình thành từ mảnh mô lá của cây thuốc lá *Nicotiana tabacum*

2.3. Nuôi cấy tế bào đơn

Sau khi xử lý mô (mảnh mô, mô sẹo hoặc dịch nuôi tế bào) với enzyme (pectinase) hoặc bằng phương pháp cơ học, các tế bào đơn được tách rời và nuôi trên môi trường dinh dưỡng để sinh trưởng và phát triển. Mảnh mô hoặc mô sẹo được chuyển sang môi trường lỏng và nuôi cấy, sau đó được khuấy trên máy lắc cơ học.

2.4. Nuôi cấy huyền phù tế bào

Sản phẩm nuôi cấy tế bào là dịch huyền phù chứa các tế bào đơn hoặc khối tế bào nhỏ được tách từ mô hoặc mô sẹo, phân tán trong môi trường lỏng (hình 3.3). Nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật thường tiến hành trong các bình phản ứng sinh học (bioreactor) để tăng quy mô sản xuất chất chuyển hoá thứ cấp.



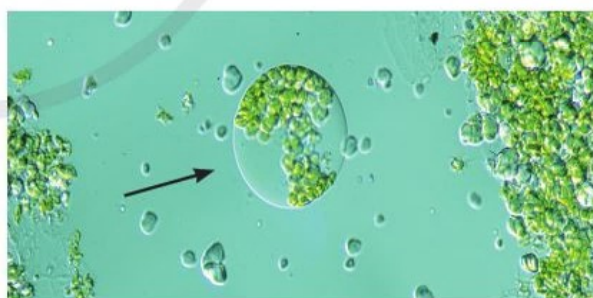
a)

b)

Hình 3.3. Nuôi cấy huyền phù tế bào từ mô sẹo (a) và tạo sinh khối từ dịch huyền phù tế bào (b)

2.5. Nuôi cấy tế bào trần

Tế bào trần là các tế bào thực vật đã bị loại bỏ thành (vách) tế bào, chỉ còn màng sinh chất bao quanh tế bào chất (hình 3.4). Tế bào trần được tạo thành bằng cách phá vỡ cơ học các mô nuôi cấy và xử lý với enzyme phân giải thành tế bào. Nuôi cấy tế bào trần cung cấp nguồn tế bào đơn trong tạo dòng tế bào, chuyển gene, tạo giống cây lai từ lai tế bào soma hoặc dùng để nghiên cứu về các cấu trúc và chức năng của tế bào.



Hình 3.4. Tế bào trần (mũi tên chỉ) được tạo thành từ tế bào mô thịt lá cây thuốc lá (Ảnh chụp với kính hiển vi quang học soi nổi, phóng đại 400 ×)

Tìm hiểu thêm

Tại sao lai (dung hợp) tế bào trần là phương pháp làm tăng tính đa dạng di truyền ở cây trồng?

Em có biết

Nhiều kĩ thuật phân tử được thao tác với tế bào trần như chuyển gene, dung hợp tế bào trần. Dung hợp tế bào trần (còn gọi là lai tế bào trần) là kĩ thuật hợp nhất các tế bào trần khác nguồn, tạo ra các tế bào lai. Xung điện hoặc chất hoá học như polyethylene glycol (PEG) được sử dụng để dung hợp tế bào trần. Sự hình thành cây lai, thậm chí lai khác loài có thể thực hiện bằng phương pháp lai tế bào trần. Năm 1972, Carlson đã thực hiện thành công việc dung hợp tế bào trần của hai loài cây thuốc lá (*Nicotiana glauca* và *N. langsdorffii*). Năm 1985, Kuchko cũng đã tạo được cây lai soma khác loài bằng dung hợp tế bào trần của cây khoai tây hoang dại (*Solanum chacoense*) và cây khoai tây trồng (*Solanum tuberosum*).



Phôi soma khác với phôi hình thành từ hợp tử như thế nào? Ứng dụng của nuôi cấy tạo phôi soma là gì?

2.6. Nuôi cấy phôi

Nuôi cấy phôi là kĩ thuật tách phôi từ hạt, có thể là phôi trưởng thành hoặc chưa trưởng thành, sau đó tiến hành nuôi cấy *in vitro*. Phôi trưởng thành thường có trong các hạt chín. Cứu phôi là kĩ thuật nuôi cấy phôi chưa trưởng thành, thường áp dụng với các hạt lai, hạt chưa chín và không tự nảy mầm được. Bằng cách cứu phôi, có thể tạo ra cây hoàn chỉnh có khả năng sống sót.

2.7. Tạo phôi soma

Phôi soma là phôi được hình thành từ các tế bào soma (tế bào sinh dưỡng) của cây mà không phải từ hợp tử. Tạo phôi soma là quá trình nuôi cấy để tế bào soma được khử biệt hoá và trở thành tế bào gốc phôi toàn năng, từ đó có khả năng phát triển thành cơ thể tương tự như phôi phát triển từ hợp tử. Nuôi cấy tạo phôi soma sử dụng các tế bào soma có nguồn gốc từ mảnh mô, tạo phôi trực tiếp trên bề mặt mảnh mô, hoặc tạo phôi gián tiếp qua nuôi cấy mô sẹo và can thiệp tạo phôi. Phôi soma được sử dụng trong nhân giống vô tính, tạo vật liệu đồng nhất về di truyền, sạch bệnh; cung cấp nguồn mô để chuyển gene, tái sinh cây từ tế bào trần và trong công nghệ hạt nhân tạo.

2.8. Nuôi cấy tạo cơ quan

Nuôi cấy tạo cơ quan là quá trình nuôi cấy mô tế bào để hình thành hoặc tái tạo cơ quan (thường là chồi thân và rễ). Các cơ quan có thể được hình thành ngẫu nhiên trên bề mặt của mảnh mô ở giai đoạn non (tạo cơ quan trực tiếp) hoặc thông qua can thiệp vào pha mô sẹo (tạo cơ quan gián tiếp). Chồi và rễ có thể hình thành từ mô phân sinh chồi của các mảnh mô nuôi cấy. Cơ quan có thể ở dạng mảnh mô có sẵn từ việc nuôi cấy *in vitro* trước đó và tiếp tục được nuôi cấy để duy trì các đặc tính như trong cơ thể (*in vivo*). Nuôi cấy tạo cơ quan được ứng dụng để sản xuất các chất chuyển hoá và để nhân giống ở một số loại cây trồng.



Tại sao trong nhân giống vô tính để duy trì đặc tính cây trồng, người ta thường tái sinh cây bằng nuôi cấy tạo cơ quan sử dụng đoạn thân cây mà không tái sinh gián tiếp từ mô sẹo?

Trong quá trình nuôi cấy, tế bào và mô tăng sinh khối nhờ các tế bào phân chia trong môi trường nuôi cấy phù hợp. Duy trì nuôi cấy hoặc cấy chuyển để tăng sinh khối và chuyển giai đoạn nuôi cấy, điều chỉnh phù hợp chất dinh dưỡng và các thành phần khác như chất điều hoà sinh trưởng, nhiệt độ, ánh sáng,... Cấy chuyển cũng là kỹ thuật giúp loại bỏ các chất gây độc tích lũy trong môi trường nuôi cấy. Khoảng thời gian giữa các lần cấy chuyển phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy và đối tượng tế bào của loài thực vật cụ thể. Chẳng hạn, thời gian cấy chuyển đối với nuôi cấy trong môi trường lỏng (huyền phù) thường từ 10 – 14 ngày, nuôi cấy trên môi trường thạch cần cấy chuyển sau mỗi 4 – 6 tuần.

Ở quy mô phòng thí nghiệm, bình nuôi cấy thường có thể tích nhỏ. Ở quy mô sản xuất, nuôi cấy được thực hiện trong các hệ thống thiết bị có thể tích lớn.

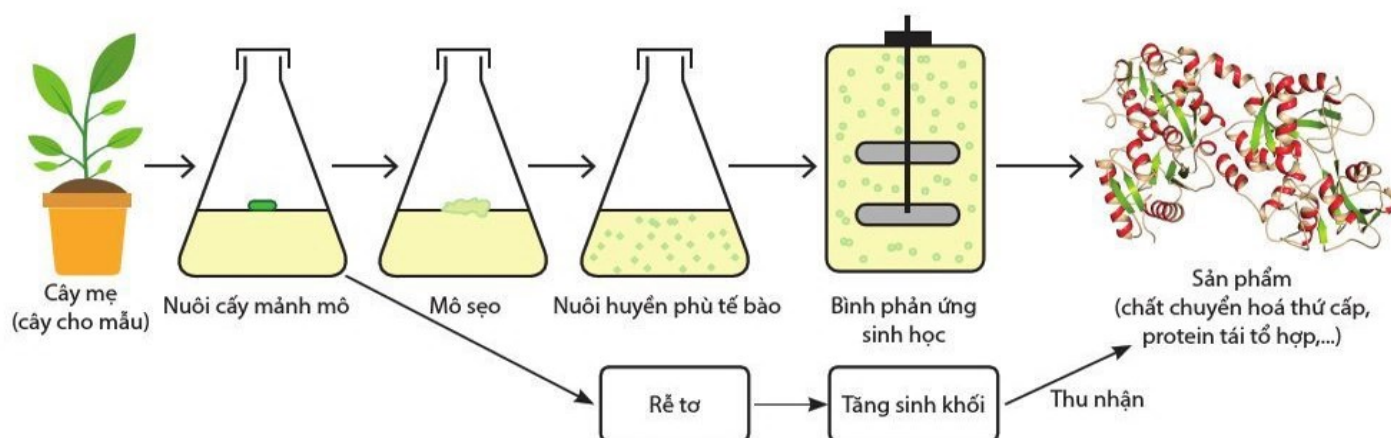
3. Giai đoạn hoàn thiện và thu nhận sản phẩm

3.1. Sản xuất chất chuyển hoá thứ cấp

Để sản xuất các chất chuyển hoá thứ cấp (hợp chất alkaloid, steroid) hoặc các sản phẩm khác như protein tái tổ hợp (sản xuất vaccine, enzyme,...), việc nuôi cấy được tiến hành với quy mô lớn trong các bình phản ứng sinh học (bioreactor). Các kỹ thuật nuôi cấy tế bào được sử dụng trong sản xuất các sản phẩm chuyển hoá thường là tạo mô sẹo, nuôi cấy huyền phù tế bào, nuôi cấy lỏng rẽ (rẽ tơ). Quá trình nuôi cấy được duy trì bằng việc bổ sung chất dinh dưỡng và cung cấp đủ điều kiện về khí và nhiệt độ. Giai đoạn cuối là thu sinh khối tế bào và tách chiết để thu nhận sản phẩm ở dạng tinh khiết (hình 3.5).



Các kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào khác nhau về mẫu sử dụng cho nuôi cấy và mục đích ứng dụng như thế nào?



Hình 3.5. Khái quát một quy trình sản xuất chất chuyển hoá thứ cấp sử dụng công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật



Em có biết, bằng cách nào có thể sản xuất vaccine ăn được (có trong rau, củ, quả) nhờ sử dụng công nghệ tế bào thực vật?

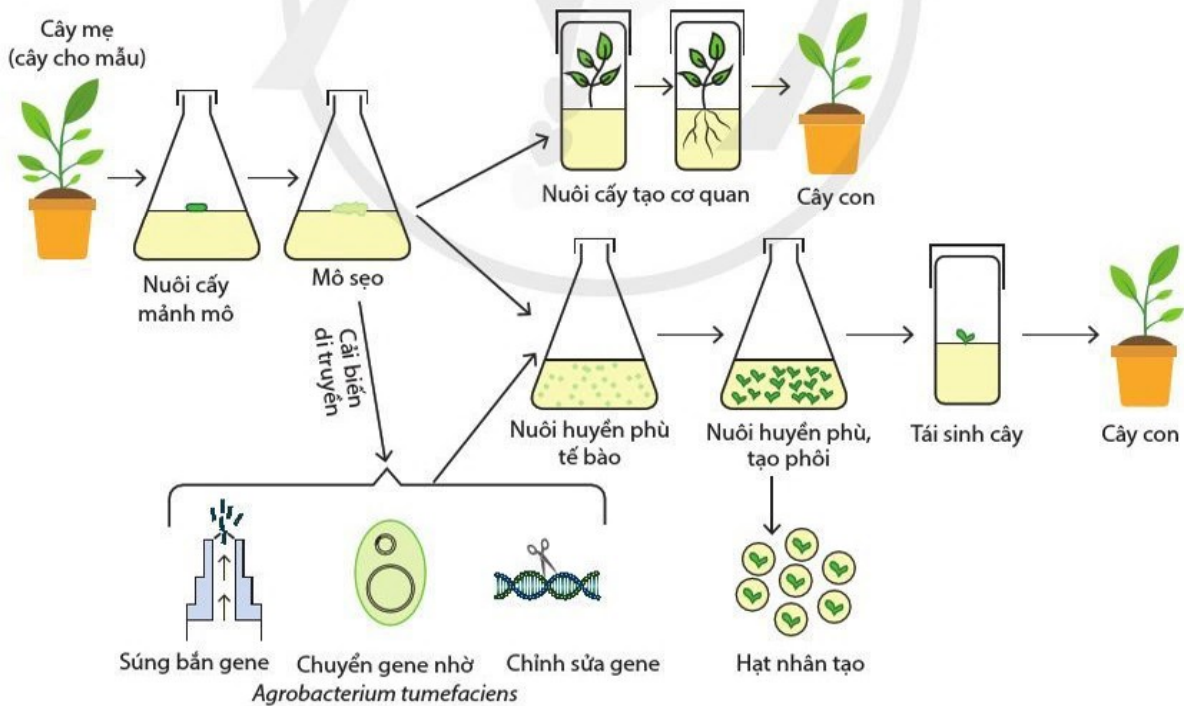
3.2. Vi nhân giống cây trồng

Mục tiêu nhân giống là tạo ra các cây trồng với số lượng lớn, trong đó có giai đoạn tái sinh cây hoàn chỉnh. Công nghệ vi nhân giống được áp dụng trong nhân giống vô tính ở nhiều loài cây trồng, đáp ứng nhu cầu về giống cây trồng và bảo tồn sinh học. Bên cạnh việc tái sinh cây hoàn chỉnh, công nghệ tế bào thực vật còn được phát triển theo hướng sản xuất hạt nhân tạo (hạt tổng hợp) góp phần lưu giữ, bảo tồn giống thực vật. Tái sinh cây hoàn chỉnh được thực hiện bằng cách áp dụng kỹ thuật nuôi cấy chồi hoặc từ mảnh mô thông qua nuôi cấy tạo phôi soma trực tiếp từ một tế bào soma hay tạo phôi soma gián tiếp từ cụm tế bào soma thông qua mô sẹo (hình 3.6).

Tái sinh cây

Tái sinh cây thông qua nuôi cấy từ chồi

Đây là quá trình nuôi cấy để nhân chồi, sau đó chuyển chồi sang môi trường ra rễ và sinh cây hoàn chỉnh. Với một số cây trồng, chồi có thể được trồng trực tiếp vào đất để rễ phát triển và tạo cây hoàn chỉnh.



Hình 3.6. Quy trình công nghệ tế bào thực vật kết hợp công nghệ gene trong vi nhân giống cây trồng

Tái sinh cây thông qua nuôi cấy tạo phôi soma

Nhờ tính toàn năng của tế bào thực vật, tạo phôi soma trực tiếp từ tế bào là quá trình nuôi cấy nhằm làm cho các tế bào đã biệt hoá một phần (ví dụ: tế bào mô mềm) trở về trạng thái giống mô phân sinh. Các tế bào này phân chia, đạt được tính toàn năng và phát triển thành phôi.

Phôi soma có thể gián tiếp được tạo thành từ mô sẹo. Trong môi trường nuôi cấy bổ sung hormone thực vật (auxin ngoại sinh), mô sẹo có khả năng biệt hoá hình thành các cấu trúc mô, cơ quan có tổ chức. Ở giai đoạn tiếp theo, cây chuyển mô sang môi trường không bổ sung auxin dẫn đến kích thích tăng nồng độ auxin nội sinh, từ đó cảm ứng mở đầu hình thành phôi soma.

Trong giai đoạn tạo cơ quan, mô sẹo hoặc phôi soma được cấy chuyển sang môi trường phù hợp để cho ra rễ và các cơ quan sinh dưỡng khác. Ở một số loài, chồi khi ở môi trường *in vitro* cũng có thể hình thành rễ.

Cây con được tạo từ chồi thân hoặc sự nảy mầm của phôi soma được tiếp tục nuôi để đạt kích thước đủ lớn và cứng cáp. Các cây giống sẽ được chuyển sang trồng riêng ra chậu, làm quen với môi trường đất và đưa ra đồng ruộng để cây phát triển tự nhiên. Quá trình này cần được tiến hành và theo dõi thận trọng để cây thích nghi với điều kiện ngoại cảnh (*ex vivo*).

Trong quá trình tái sinh cây, các điều kiện khác như nhiệt độ, cường độ và thời gian chiếu sáng cũng cần đáp ứng phù hợp cho từng giai đoạn, từng loài cây trồng khác nhau.

Sản xuất hạt nhân tạo

Hạt nhân tạo được tạo bởi phôi soma hoặc các phần sinh dưỡng của cây như chồi thân, chồi bên được bọc gói lại, ở trạng thái ngủ và có thể trở thành cây hoàn chỉnh khi nuôi cấy *in vitro*. Kỹ thuật sản xuất hạt nhân tạo là một trong các công nghệ nhân giống vô tính hiện đại, được áp dụng với nhiều cây trồng có giá trị thương mại, gồm các cây rau, quả, cây dược liệu, cây cảnh, ngũ cốc và cây lâm nghiệp. Công nghệ sản xuất hạt nhân tạo giúp tạo ra các cây đa bội mang các tính trạng quý, tránh được hiện tượng tái tổ hợp như phương pháp lai hữu tính. Đây còn là kỹ thuật tạo cây chuyển gene khi gene được chuyển vào tế bào soma và tạo phôi, tạo hạt cho những cây bất thụ.



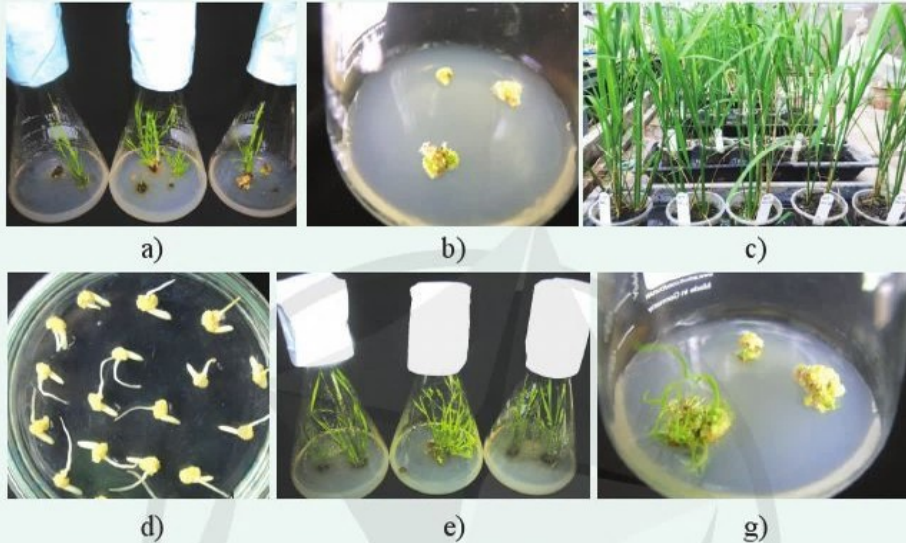
Những kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật nào có thể áp dụng sau khi tạo mô sẹo? Hãy nêu định hướng tạo sản phẩm cuối cùng của các quá trình công nghệ đó.

Tìm hiểu thêm

Kĩ thuật vi nhân giống (nhân giống vô tính) được ứng dụng trong những trường hợp nào? Khi nào thì nên áp dụng kĩ thuật này mà không phải là nhân giống từ hạt tạo từ lai hữu tính?



1. Quan sát các hình (a – g) về quá trình tái sinh cây lúa (*Oryza sativa*) từ nuôi cấy mô tế bào và thực hiện các yêu cầu sau:
 - a. Cho sẵn các mô tả sau: (1) Sau 35 ngày tái sinh; (2) Sau 17 ngày trên môi trường tái sinh; (3) Sau 9 ngày trên môi trường tái sinh; (4) Nuôi cấy tạo mô sẹo từ phôi hạt; (5) Đưa cây ra nhà lưới; (6) Sau 25 ngày tái sinh. Hãy ghép mỗi mô tả này (1– 6) với mỗi hình (a – g) cho phù hợp.
 - b. Sắp xếp các chữ cái kí hiệu mỗi hình theo tiến trình thời gian thực hiện các giai đoạn nuôi cấy mô tế bào và tái sinh ở cây lúa.



2. Thiết lập các bước tiến hành sản xuất một loại vaccine để phòng bệnh truyền nhiễm sử dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào cây thuốc lá, kết hợp kĩ thuật chuyển gene vào tế bào thực vật nuôi cấy nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (tham khảo hình 3.6).

III. THỰC HIỆN ĐỀ TÀI TÌM HIỂU VỀ THÀNH TỰU CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

1. Mục tiêu

- Tìm kiếm và thu thập được thông tin từ tài liệu khoa học.
- Trình bày được báo cáo tổng quan về các thành tựu công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Thiết kế được tập san gồm hình ảnh, bài viết về thành tựu công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật.

2. Nội dung tìm hiểu

- Thành tựu của công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật ứng dụng trong chọn tạo giống cây trồng mới, nhân nhanh giống cây trồng.
- Thành tựu công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật trong sản xuất các hợp chất thứ cấp.

3. Chuẩn bị

- Máy tính kết nối internet.
- Sách, tạp chí khoa học đã xuất bản dạng in hoặc bản điện tử tại các trang web.

4. Tiến hành

- Chia nhóm và phân công thực hiện nội dung tìm hiểu.
- Học sinh tìm kiếm thông tin từ cơ sở dữ liệu khoa học được công bố; liên hệ thực tế ở địa phương để tìm hiểu về các thành tựu của công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Thảo luận nhóm, thống nhất về nội dung và hình thức báo cáo.
- Gợi ý: Báo cáo có thể gồm các phần sau:

- Mục tiêu tìm hiểu
- Phương pháp thực hiện
- Nội dung và kết quả tìm hiểu

Mỗi nhóm có thể tìm hiểu một hoặc một số nội dung sau:

- + Thành tựu của nuôi cấy mô tế bào thực vật trong tạo giống cây trồng mới;
- + Thành tựu của nuôi cấy mô tế bào thực vật trong nhân giống cây trồng;
- + Thành tựu của nuôi cấy mô tế bào thực vật trong sản xuất chất chuyên hoá thứ cấp.

- Kết luận
- Tài liệu tham khảo

5. Báo cáo kết quả

- Các nhóm trình bày kết quả tìm hiểu và thảo luận chung cả lớp.
- Xây dựng tập san thu hoạch kết quả tìm hiểu về thành tựu công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật (hình ảnh, bài viết, ...).



- Công nghệ tế bào thực vật bao gồm các quy trình kĩ thuật với nhiều giai đoạn. Các giai đoạn chung gồm: chuẩn bị và thu nhận mẫu; chuẩn bị môi trường nuôi cấy; tiến hành nuôi cấy theo kĩ thuật phù hợp; mở rộng quy mô nuôi cấy và thu sản phẩm.
- Công nghệ tế bào thực vật được ứng dụng để sản xuất các sản phẩm là các hợp chất chuyển hoá thứ cấp, protein tái tổ hợp, các chất có hoạt tính sinh học. Theo hướng ứng dụng này, quá trình nuôi cấy mô tế bào thực vật gồm các giai đoạn: nuôi cấy tăng sinh khối tế bào (thường là huyền phù tế bào từ mô sẹo) trong các bình phản ứng sinh học (bioreactor), thu tế bào và tinh sạch sản phẩm.
- Công nghệ nuôi cấy mô tế bào trong vi nhân giống thường bao gồm các kĩ thuật: nuôi cấy tạo mô sẹo từ mảnh mô, tạo phôi soma hoặc tạo cơ quan (tái sinh chồi), tái sinh cây hoàn chỉnh, chuyển ra vườn ươm hoặc đồng ruộng.

Bài 4 CƠ SỞ CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT VÀ ỨNG DỤNG

Học xong bài học này, em có thể:

- Trình bày được khái niệm và ứng dụng của công nghệ tế bào động vật.
- Tranh luận và phân biệt được các quan điểm về nhân bản vô tính động vật, con người.



Hình 4.1. Thịt nhân tạo – nguồn thực phẩm tiềm năng



“Thịt nuôi cấy” (thịt nhân tạo, hình 4.1) được sản xuất như thế nào? Sản xuất thịt nuôi cấy mang lại những lợi ích tiềm năng gì đối với con người?

I. KHÁI QUÁT VỀ CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT

Kể từ cuối thế kỉ XIX, từ phát minh về kĩ thuật nuôi cấy mô ếch của Ross Harrison (1907) cho tới nay, công nghệ tế bào động vật đã hình thành và phát triển với hàng loạt các thành tựu to lớn, ứng dụng rộng rãi và ảnh hưởng quan trọng đối với đời sống con người.

Công nghệ tế bào động vật bao gồm các quy trình kĩ thuật nuôi cấy mô và tế bào động vật trên môi trường *in vitro* để tạo ra tế bào, mô, cơ quan và sản xuất các sản phẩm có giá trị thương mại.

Trong nuôi cấy mô tế bào động vật *in vitro*, tế bào tăng trưởng và phân chia, có thể hình thành các dòng tế bào (trong nuôi cấy tế bào), mô (trong nuôi cấy mô) hoặc cơ quan (trong nuôi cấy cơ quan). Các yếu tố như nhiệt độ, pH, khí (CO_2 , O_2), áp suất thẩm thấu, các chất dinh dưỡng và các chất điều hoà sinh trưởng,... của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh để đạt tới điều kiện tương tự môi trường trong cơ thể sống (*in vivo*).

Công nghệ tế bào động vật hiện nay được áp dụng để sản xuất các dòng tế bào, mô phục vụ nghiên cứu y học, sinh học và sản xuất các sản phẩm khác có giá trị kinh tế.



Dựa trên đặc tính sinh học nào của tế bào động vật mà người ta có thể nuôi cấy được mô tế bào trong phòng thí nghiệm?

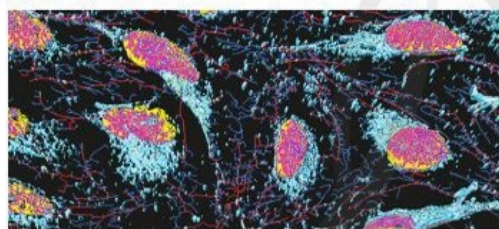
Em có biết

Trong những năm 1880, Sydney Ringer đã tiến hành nghiên cứu tách tim ếch và ngâm trong dung dịch NaCl 0,75 %, sau đó bổ sung một số thành phần như máu và albumin, tạo nên dung dịch Ringer. Quan sát thấy tim ếch vẫn hoạt động trong một thời gian, Ringer khẳng định, máu và albumin có vai trò duy trì hoạt động của tim ếch trong dung dịch muối. Dựa trên cơ sở đó, các nhà khoa học tiếp tục phát triển dung dịch Ringer thành dung dịch lactate Ringer, được dùng để bổ sung nước và chất điện giải cho cơ thể. Phát minh của Sydney Ringer về môi trường duy trì hoạt động của tim ếch bên ngoài cơ thể có ý nghĩa quan trọng và là tiền đề của nuôi cấy mô tế bào động vật.

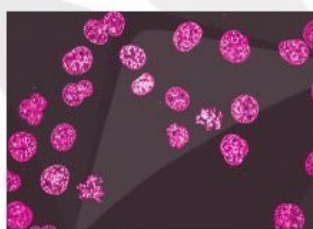
II. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT

1. Sản xuất các dòng tế bào cho nghiên cứu và ứng dụng

Công nghệ nuôi cấy mô tế bào động vật cung cấp các dòng tế bào dùng cho nghiên cứu sinh học tế bào, chẳng hạn nghiên cứu chu kì tế bào, chức năng tế bào, tương tác giữa tế bào với tế bào hoặc giữa tế bào với cơ chất. Các dòng tế bào còn được sử dụng trong thử nghiệm độc tính nhằm nghiên cứu tác động của thuốc mới hoặc trong liệu pháp gene. Ngoài ra, dòng tế bào còn được sử dụng trong nghiên cứu ung thư, tác động của hoá chất, bức xạ và virus với tế bào ung thư. Chẳng hạn, các dòng tế bào ung thư như HeLa (tế bào ung thư cổ tử cung), HT29 (tế bào ung thư đại tràng), K562 (tế bào ung thư bạch cầu), nguyên bào sợi thận chuột hamster BHK-21, dòng tế bào biểu mô gan người HEPG2, các dòng tế bào biến đổi gene,... được sử dụng cho nghiên cứu. Các dòng tế bào gốc vạn năng cảm ứng (iPSC, xem Bài 6), là nguồn tế bào gốc để biệt hoá thành các mô khác và được dùng cho mục đích trị liệu.



a)



b)

Hình 4.2. Dòng tế bào ung thư HeLa (a) và dòng tế bào ung thư bạch cầu người K562 (b).

Em có biết

Dòng tế bào hữu hạn và dòng tế bào vô hạn

Dựa vào khả năng tăng trưởng hữu hạn hoặc liên tục khi được cấy chuyển từ dịch nuôi sơ cấp, dòng tế bào tạo thành được chia thành hai loại:

- **Dòng tế bào hữu hạn** là các tế bào có khả năng tăng sinh giới hạn. Đó thường là các tế bào lưỡng bội bình thường, có thể trải qua 40 – 50 lần phân chia và biệt hoá ở một mức độ nhất định, tốc độ tăng trưởng chậm, phụ thuộc bề mặt dính bám và mật độ tế bào.
- **Dòng tế bào vô hạn** là các tế bào có khả năng tăng sinh vô hạn khi tiếp tục được nuôi trong điều kiện tối ưu. Có hai loại dòng tế bào có khả năng tăng sinh vô hạn, gồm dòng tế bào bất tử và dòng tế bào gốc.
 - **Dòng tế bào bất tử** là dạng biến đổi thành tế bào ung thư, có nguồn gốc từ khối u trong cơ thể hoặc tạo thành từ thực nghiệm. Các tế bào ung thư tạo thành do virus, tác nhân hoá học hoặc vật lí, có khả năng nuôi cấy được vô hạn.
 - **Dòng tế bào gốc** là những tế bào có khả năng tự tái tạo và biệt hoá thành loại tế bào hoặc mô bất kì. Tế bào gốc có tiềm năng được sử dụng để tạo thành các cơ quan có đầy đủ chức năng, khoẻ mạnh nhằm thay thế các cơ quan bị hỏng hoặc bị bệnh.



1. Vì sao các dòng tế bào nuôi cấy có thể được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu sinh học?
2. Em hãy kể tên một số dòng tế bào đã được thương mại hoá và sử dụng trong nghiên cứu



Hãy tìm thông tin về một số loại vaccine phòng bệnh do virus được sản xuất bằng công nghệ tế bào động vật và công nghệ tế bào động vật kết hợp với công nghệ gene.

2. Sản xuất các chế phẩm thương mại

Sản xuất vaccine phòng bệnh do virus

Công nghệ tế bào động vật tạo khả năng thay thế cho việc sử dụng động vật sống trong sản xuất kháng nguyên, là nguyên liệu tạo ra vaccine. Hệ thống sản xuất vaccine hiện đại sử dụng các dòng tế bào động vật nuôi cấy có thể khắc phục hạn chế về sự phụ thuộc chất lượng nguyên liệu của các hệ thống sản xuất vaccine dựa vào trứng gia cầm. Nhờ kết hợp công nghệ tế bào với công nghệ gene, nhiều loại vaccine tái tổ hợp được sản xuất với lượng lớn. Ví dụ: về loại vaccine có tính an toàn cao, được sản xuất dựa vào công nghệ tế bào động vật là vaccine cấu trúc tương tự virus hay các vaccine phòng bệnh cúm.

Sản xuất protein tái tổ hợp trị liệu

Protein tái tổ hợp được biểu hiện sau khi chuyển vector tái tổ hợp mang gene đích vào tế bào động vật nuôi cấy. Protein tái tổ hợp được sản xuất bằng công nghệ tế bào bao gồm các chất chống ung thư, enzyme, các chất sinh miễn dịch như interleukin, lymphokine, kháng thể đơn dòng và hormone.

Tim hiểu thêm

Liệu pháp gene được áp dụng hoặc có tiềm năng áp dụng điều trị bệnh nào ở người?



Hình 4.3. Sâu bướm bị tiêu diệt khi phun thuốc trừ sâu sinh học.

Nuôi cấy tế bào và liệu pháp gene

Liệu pháp gene với việc chèn thêm, loại bỏ hoặc thay thế gene hỏng bằng gene lành hoặc gene có khả năng hoạt động chức năng nhằm mục đích chữa bệnh, làm chậm lại quá trình tiến triển bệnh, nhờ đó cải thiện được chất lượng cuộc sống của con người. Trong liệu pháp gene *in vivo*, gene lành được đưa vào cơ thể ở một vị trí đặc thù. Trong liệu pháp gene ngoài cơ thể (*ex vivo*), các tế bào đích được xử lý bên ngoài cơ thể bệnh nhân. Các tế bào này sau đó được nhân lên và chuyển lại vào cơ thể ở một vị trí đặc thù là mô đích. Liệu pháp gene *ex vivo* đã được áp dụng để điều trị các bệnh về thần kinh, bệnh thiếu hụt miễn dịch phức hợp nghiêm trọng,... Trong thực tế, đây là phương pháp đã được thực hiện ở giai đoạn tiền lâm sàng trên động vật và các thử nghiệm lâm sàng ở người.

Sản xuất thuốc trừ sâu sinh học

Thuốc trừ sâu sinh học là những chế phẩm được sử dụng hiệu quả trong kiểm soát côn trùng và bệnh cây trồng. Tuy nhiên, trở ngại lớn trong việc sản xuất đại trà chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học là giá thành cao. Việc phát triển quy trình nuôi cấy tế bào *in vitro* để sản xuất lượng lớn thuốc trừ sâu sinh học có thể làm giảm giá thành so với sản xuất thuốc trừ sâu hoá học, góp phần cung cấp nguồn thực phẩm sạch và an toàn đối với môi trường. Ví dụ: nuôi cấy tế bào côn trùng để lây nhiễm baculovirus trong sản xuất thuốc trừ sâu sinh học baculovirus. Đây là loại thuốc trừ sâu sinh học có hiệu quả cao trong phòng trừ sâu bướm hại cây (hình 4.3).

Sản xuất kháng thể đơn dòng

Phần lớn kháng thể có trên thị trường ngày nay được tạo ra nhờ công nghệ tế bào động vật, trong đó công nghệ lai tế bào được sử dụng rộng rãi để sản xuất kháng thể đơn dòng. Một số dòng tế bào hiện đang được sử dụng để sản xuất kháng thể đơn dòng như CHO (dòng tế bào buồng trứng chuột hamster), NSO (tế bào u tủy), HEK-93 (dòng tế bào thận phôi người) và BHK (dòng tế bào thận chuột hamster nhỏ).

Nuôi cấy 3D vi lỏng

Nghiên cứu sinh học người và phát triển thuốc trị liệu thường dựa vào hệ thống nuôi cấy tế bào đơn lớp hai chiều (2D), trong đó, tế bào nuôi tạo đơn lớp trên bề mặt phẳng và rắn. Tuy nhiên, hệ thống này không tái hiện được chính xác cấu trúc, chức năng, sinh lý học của các mô sống, không phản ánh được mức độ phức tạp cao và môi trường động học ba chiều (3D) *in vivo*. Công nghệ nuôi tế bào 3D vi lỏng có thể cung cấp các cấu trúc hiển vi phức tạp và các thông số được điều khiển chính xác để bắt chước được môi trường *in vivo* của tế bào. Các thiết bị vi lỏng được dùng để điều khiển chất lỏng trong mao mạch nhỏ hoặc vi kênh. Sự kết hợp công nghệ vi lỏng với mô tế bào 3D đưa ra tiềm năng lớn cho việc ứng dụng dựa vào mô tương tự trong cơ thể, chẳng hạn hệ cơ quan trên chip điện tử.

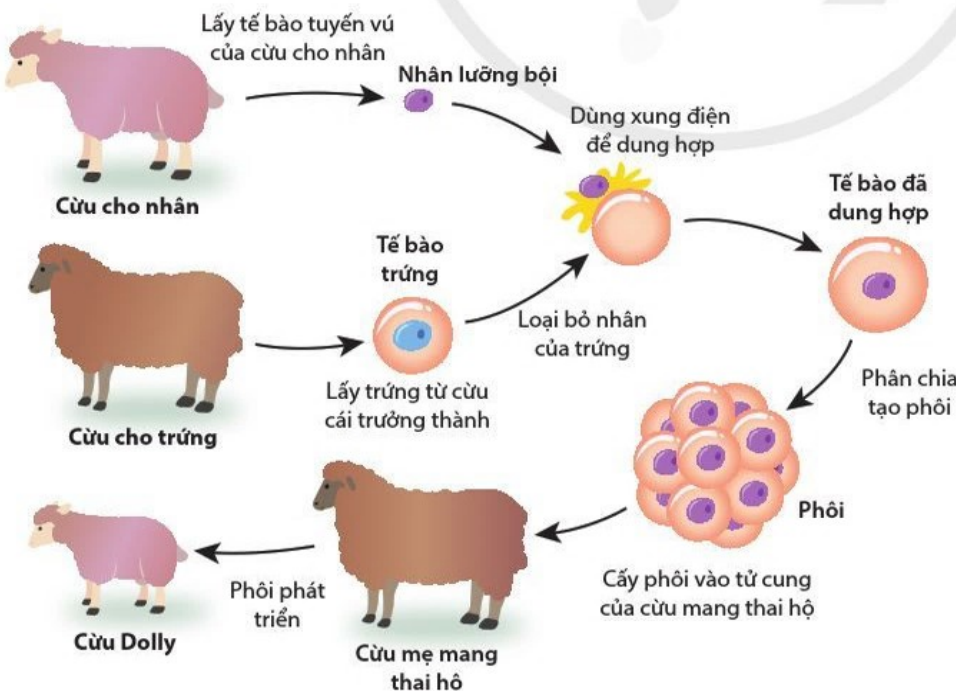


Hãy kể thêm các ứng dụng khác của công nghệ tế bào động vật trong nghiên cứu và trong sản xuất các sản phẩm thương mại.



Tìm hiểu về một số sản phẩm sinh dược được sản xuất bằng công nghệ tế bào động vật.

4. Nhân bản vô tính động vật



Quan sát hình 4.4 và cho biết cừu Dolly được nhân bản vô tính bằng cách nào. Cừu Dolly có đặc điểm di truyền giống con cừu nào được nêu trong hình?

Hình 4.4. Quy trình tạo cừu Dolly – động vật có vú đầu tiên được nhân bản vô tính



Theo em, tuổi sinh học của cừu Dolly có tương ứng với tuổi thực của nó không? Giải thích. Từ đó, hãy cho biết, cần lưu ý điều gì khi thực hiện nhân bản vô tính động vật có vú bằng phương pháp chuyển nhân tế bào soma vào tế bào trứng đã loại bỏ nhân.

Năm 1996, cừu Dolly cái là động vật có vú đầu tiên được nhân bản vô tính, ra đời từ nghiên cứu của Ian Wilmut và cộng sự tại Viện Roslin (Scotland). Đây là sự kiện đột phá trong khoa học, mở ra khả năng nhân bản động vật có vú và cũng khởi đầu cho những tranh luận liên quan đến phát triển và ứng dụng công nghệ nhân bản động vật có vú.

Bằng công nghệ này, hai hoặc nhiều cá thể giống nhau về mặt di truyền có thể được tạo thành. Kể từ khi cừu Dolly ra đời đến nay, nhân bản vô tính đã được thực hiện thành công ở nhiều loài động vật có vú như cừu, mèo, lợn, ... Tuy nhiên, động vật có vú tạo ra từ nhân bản vô tính có nguy cơ bộc lộ những sai hỏng bất thường trong quá trình phát triển. Cho đến nay, câu hỏi liệu có cho phép nhân bản vô tính người hay không vẫn còn là vấn đề gây tranh cãi. Nhiều quốc gia và các tổ chức quốc tế không cho phép nhân bản vô tính người.



Nêu quan điểm về những lợi ích và nguy cơ của nhân bản vô tính ở động vật có vú. Em ủng hộ hay phản đối việc nhân bản vô tính động vật có vú và người? Vì sao?



- Công nghệ tế bào động vật gồm các quy trình kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào động vật nhằm duy trì khả năng tăng trưởng và phân chia của tế bào trong điều kiện *in vitro*, tạo nên các dòng tế bào (nuôi cấy tế bào), mô (nuôi cấy mô), cơ quan (nuôi cấy cơ quan) và sản xuất các sản phẩm phục vụ đời sống.
- Công nghệ tế bào động vật có nhiều ứng dụng quan trọng trong nghiên cứu và sản xuất các sản phẩm phục vụ đời sống con người, đặc biệt các ứng dụng trong lĩnh vực y dược học.
- Nhân bản vô tính ở động vật là một trong những thành tựu của công nghệ tế bào, có tiềm năng ứng dụng. Tuy nhiên, cần lưu ý các khía cạnh đạo đức và những nguy cơ khi thực hiện nhân bản vô tính ở động vật, đặc biệt là động vật có vú. Nhân bản vô tính ở người chưa được chấp nhận ở rất nhiều quốc gia trên thế giới.

Bài 5 CÁC GIAI ĐOẠN CỦA CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT

Học xong bài học này, em có thể:

- Trình bày được các giai đoạn chính của công nghệ tế bào động vật.
- Nêu được ví dụ minh họa quy trình công nghệ tế bào động vật.



- Để có được dòng tế bào buồng trứng chuột hamster (CHO), theo em, người ta phải thực hiện các giai đoạn nuôi cấy mô tế bào nào?
- Bằng cách nào mà kháng thể đơn dòng được sản xuất với số lượng lớn?

I. CÁC GIAI ĐOẠN CỦA CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT

1. Giai đoạn chuẩn bị mẫu và môi trường nuôi cấy

Mẫu nuôi cấy là mô hoặc cơ quan, các mảnh mô nhỏ hoặc các mẫu được lấy từ cơ thể sinh vật (mẫu sinh thiết). Phương pháp cơ học (cắt nhỏ mô) áp dụng trong hầu hết các quy trình nuôi cấy. Trong nuôi cấy tế bào, sau khi cắt, mẫu được xử lý với enzyme (ví dụ: trypsin, collagenase hoặc versene) để phá vỡ liên kết giữa các tế bào, liên kết giữa tế bào và chất nền ngoại bào và giải phóng tế bào ra môi trường. Sau khi phản ứng trypsin hoá hoàn toàn và tế bào được phân tách, huyết thanh được bổ sung để trung hoà hoạt tính enzyme.

Tìm hiểu thêm

Tại sao trong nuôi cấy tế bào động vật, người ta thường phải xử lý mẫu mô bằng cơ học (cắt nhỏ) kết hợp với xử lý bằng enzyme trypsin?



Hãy quan sát sơ đồ ở hình 5.1 và cho biết công nghệ tế bào động vật gồm những giai đoạn nào?



Hình 5.1. Quy trình khái quát về công nghệ tế bào động vật

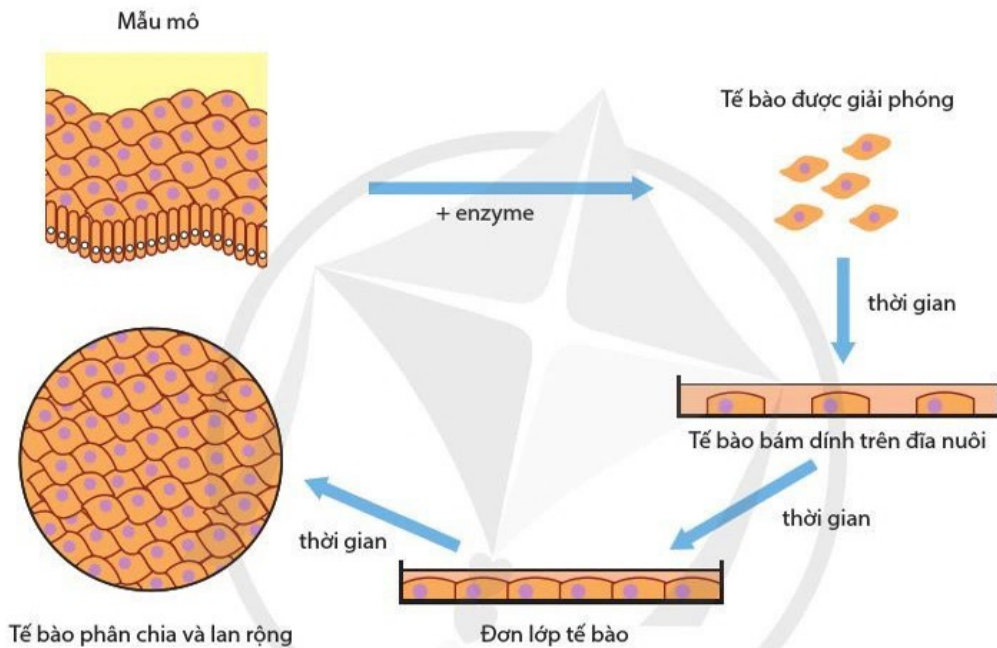
Mẫu tế bào thu được sau đó sẽ được sử dụng cho giai đoạn tiến hành nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được chuẩn bị với thành phần dinh dưỡng và các chất bổ sung phù hợp với mục tiêu và kĩ thuật nuôi cấy được áp dụng.

Dựa vào mục đích nghiên cứu hoặc sản xuất, quá trình nuôi cấy được thực hiện với các mẫu khác nhau: nuôi cấy tế bào, nuôi cấy mảnh mô, nuôi cấy cơ quan, nuôi cấy tạo cơ quan.

2. Giai đoạn nuôi cấy

Dựa vào mục đích nghiên cứu hoặc sản xuất, quá trình nuôi cấy được thực hiện trên các mẫu khác nhau: Nuôi cấy tế bào, nuôi cấy mảnh mô, nuôi cấy cơ quan, nuôi cấy tạo cơ quan.

Để tạo các dòng tế bào, nuôi cấy tế bào được tiến hành qua các giai đoạn nuôi cấy sơ cấp và nuôi cấy thứ cấp (nuôi cấy liên tục).



Hình 5.2. Quá trình nuôi cấy sơ cấp tạo đơn lớp tế bào

Nuôi cấy sơ cấp

Đây là bước khởi đầu của nuôi cấy tế bào. Mẫu là mô, mảnh cắt mô hoặc cơ quan trên môi trường ngoài cơ thể. Trong môi trường dinh dưỡng phù hợp, các tế bào sau khi tách khỏi mô tiếp tục tăng trưởng và phân chia. Sản phẩm của nuôi cấy sơ cấp là dịch nuôi sơ cấp hoặc đơn lớp tế bào (hình 5.2), giống tế bào ở mô của cơ thể. Dịch nuôi sơ cấp ban đầu thường không đồng nhất, sau một thời gian, dòng tế bào đại diện ở mô được nuôi cấy trở nên vượt trội. Dịch nuôi sơ cấp chỉ duy trì trong thời gian ngắn do các tế bào dừng phân chia (già hoá) sau một số lần phân bào. Nuôi cấy sơ cấp cung cấp mô hình cho nghiên cứu các đặc tính sinh lí, sinh hoá của tế bào và tác động của thuốc, độc tố đối với tế bào.



Đặc điểm của dịch nuôi sơ cấp là gì? Vì sao dịch nuôi sơ cấp có đặc điểm đó? Hãy sưu tầm thông tin về các dòng tế bào sơ cấp và ứng dụng của chúng.



1. Hãy nêu sự khác biệt giữa nuôi cấy huyền phù và nuôi cấy đơn lớp.
2. Yếu tố nào quyết định sự hình thành dạng huyền phù và dạng đơn lớp của sản phẩm nuôi cấy tế bào động vật?

Nuôi cấy thứ cấp

Để duy trì khả năng sống và phân chia của tế bào trong thời gian dài, cần bổ sung môi trường chất dinh dưỡng. Vì vậy, nuôi cấy thứ cấp được thực hiện bằng cách chuyển một phần dịch nuôi sơ cấp sang môi trường dinh dưỡng mới, nhờ đó tạo ra lượng lớn tế bào (dịch nuôi thứ cấp). Quá trình chuyển một phần dịch nuôi sang môi trường nuôi cấy mới để tế bào tiếp tục tăng sinh được gọi là cấy chuyền (hình 5.3). Tế bào tăng trưởng và dịch nuôi thứ cấp có thể tồn tại trong thời gian dài hơn so với tế bào trong dịch nuôi sơ cấp do được cung cấp chất dinh dưỡng mới vào những khoảng thời gian đều đặn.

Thời gian giữa các lần cấy chuyền phụ thuộc vào dòng tế bào và tốc độ tăng trưởng. Ví dụ: tế bào ung thư cổ tử cung người HeLa và tế bào Vero (có nguồn gốc từ mô thận của khỉ xanh châu Phi) cần khoảng 4 ngày đến 1 tuần để cấy chuyền; nguyên bào sợi HEL (tế bào nguyên bào sợi từ phổi ở thai người) cần 10 – 14 ngày cho mỗi lần cấy chuyền.



Hình 5.3. Dịch nuôi sơ cấp (a) được cấy chuyền sang môi trường mới (b)

Dựa vào đặc tính, nguồn gốc mô và khả năng thích ứng của tế bào trong quá trình tăng trưởng và phân chia trong môi trường nuôi cấy, có thể thực hiện kiểu nuôi cấy huyền phù hoặc nuôi cấy đơn lớp.

Nuôi cấy huyền phù

Trong môi trường nuôi cấy dạng lỏng và được khuấy, các tế bào phân chia và duy trì trong bình nuôi tạo nên dịch huyền phù tế bào. Nuôi cấy huyền phù tạo nên dịch chứa các tế bào được nuôi cấy tách rời nhau hoặc tạo thành đám trôi nổi trong môi trường nuôi.

Một số loại tế bào phù hợp với kiểu nuôi cấy huyền phù, như các tế bào bắt nguồn từ mô máu (tế bào bạch cầu, tế bào lympho) do chúng có đặc tính không phụ thuộc dính bám.

Nuôi cấy đơn lớp

Nhiều loại tế bào có tính phụ thuộc dính bám. Do đó, khi được nuôi trên cơ chất tạo nên bề mặt phù hợp, chúng có thể dính bám và lan rộng, hình thành đơn lớp tế bào.



Nêu đặc tính khác biệt nổi bật giữa tế bào nuôi cấy đơn lớp và tế bào nuôi cấy huyền phù

Nuôi cấy đơn lớp được thực hiện với các tế bào bắt nguồn từ mô rắn như phổi, thận, nguyên bào sợi.

Sản phẩm của nuôi cấy tế bào thứ cấp là các dòng tế bào (xem bài 4). Các dòng tế bào nuôi cấy được sử dụng trong nghiên cứu các đặc tính hình thái, sinh lí của tế bào; nghiên cứu vi sinh học, ảnh hưởng của bức xạ, sàng lọc thuốc, tác nhân ung thư, tác nhân đột biến,...

3. Giai đoạn thu nhận sản phẩm công nghệ tế bào

3.1. Thu nhận dòng tế bào

Từ quá trình nuôi tế bào sơ cấp hoặc từ các dịch nuôi tế bào thương mại có sẵn, dịch nuôi được nuôi cấy thứ cấp (cấy chuyển). Hệ thống nuôi cấy tế bào trên cơ chất nhân tạo sẽ thu nhận dòng tế bào dính bám hoặc trên môi trường lỏng sẽ thu nhận dịch huyền phù tế bào trôi nổi. Dịch nuôi được duy trì trong các bình nuôi cấy bằng kỹ thuật cấy chuyển.

Sản phẩm thu được từ quá trình cấy chuyển là dòng tế bào ổn định, thường là tế bào động vật có vú hoặc tế bào côn trùng.

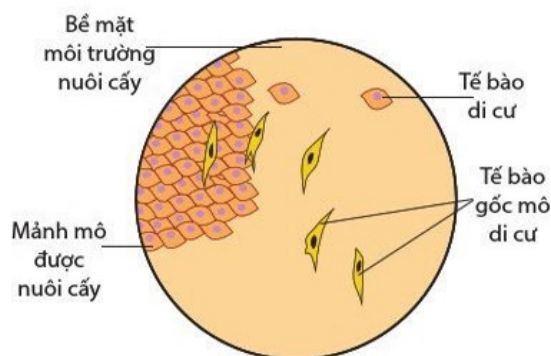
Với các mục đích khác nhau, dòng tế bào được tiếp tục xử lí bằng kỹ thuật phù hợp và thu nhận sản phẩm cuối cùng.

Dòng tế bào biến đổi gene

Các kỹ thuật chuyển gene được sử dụng để đưa gene ngoại lai vào tế bào nuôi cấy. Trong công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp, DNA tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào nuôi cấy và biểu hiện protein mục tiêu trong môi trường phù hợp. Sản phẩm nuôi cấy là enzyme hoặc các protein để định hướng sản xuất thuốc. Dòng tế bào chuyển gene có thể được sử dụng trong nghiên cứu cấu trúc, chức năng protein.

Dòng tế bào bất tử và dòng tế bào lai bất tử

Dòng tế bào bất tử được thu nhận bằng các phương pháp khác nhau như: nuôi cấy mẫu mô ung thư; chuyển gene virus; gây đột biến trên tế bào nuôi cấy; chuyển gene mã hoá protein quy định khả năng bất tử, như telomerase. Ngoài ra, công nghệ tế bào lai (hybridoma) cũng được áp dụng để thu được dòng tế bào B trong công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng.



Hình 5.4. Nuôi cấy mảnh mô

3.2. Nuôi cấy mảnh mô

Các mảnh mô được chuẩn bị bằng cách cắt thành khối nhỏ (dày khoảng 0,5 – 1,0 mm), sau đó đặt vào giếng nuôi cấy và ủ trong một thời gian (hình 5.4). Môi trường nuôi cấy thường cần có cơ chất ngoại bào để tế bào dính bám. Nuôi cấy mảnh mô có thể tạo điều kiện cho tế bào ở môi trường tương tự như trong cơ thể.

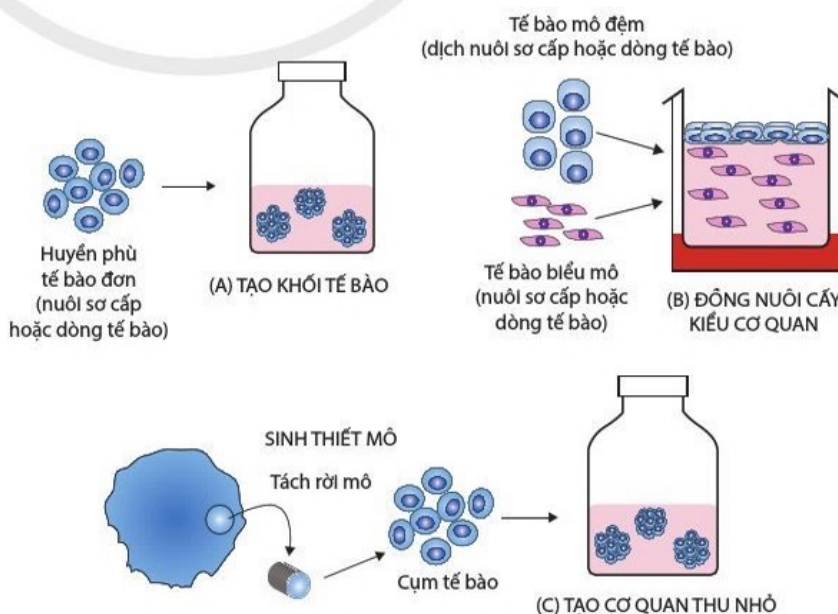
Nuôi cấy mảnh mô thường áp dụng với mô phôi hoặc mô sơ sinh để nghiên cứu sự phát triển phôi, ứng dụng trong cấy ghép tế bào vào mô nuôi cấy; nghiên cứu đặc điểm tăng trưởng của tế bào ung thư; đặc biệt là so sánh tốc độ tăng trưởng và hình thái tế bào ung thư với tế bào bình thường. Ngoài ra, nuôi cấy mảnh mô còn được sử dụng trong nghiên cứu biểu hiện gene; cơ chế tác động của các yếu tố điều hoà tăng trưởng trong các giai đoạn phát triển phôi; nghiên cứu đáp ứng với thuốc điều trị ung thư và xác định các chỉ thị sinh học (biomarker). Tuy nhiên, do thời gian nuôi cấy mảnh mô chỉ là vài tuần nên khó áp dụng để nghiên cứu các bệnh mạn tính hoặc không phù hợp cho các nghiên cứu cần thời gian dài.

3.3. Nuôi cấy cơ quan

Toàn bộ cơ quan từ phôi hoặc một phần cơ quan trưởng thành được cắt từ sinh vật để bắt đầu nuôi cấy *in vitro*. Sau khi được cắt với kích thước phù hợp, thường dày dưới 1 mm, mẫu mô cơ quan được đặt vào giá thể (gel thạch bán lỏng, huyết tương sợi hoặc màng lọc vi lỗ) và ủ trong bể ủ CO₂ ẩm. Môi trường nuôi cấy cơ quan được thay mới, bổ sung thường xuyên để đạt điều kiện dinh dưỡng và trao đổi khí phù hợp cho sự hình thành và phát triển cơ quan. Phân tích mô học, đánh dấu và chụp phóng xạ chụp ảnh và nhuộm tiêu bản mẫu mô cho biết cấu trúc và chức năng sinh học. Do được duy trì cấu trúc ba chiều (3D) các đặc tính mô học, cơ quan nuôi cấy có thể biểu hiện các đặc tính như trong cơ thể. Nuôi cấy cơ quan được ứng dụng để nghiên cứu chức năng của tế bào (ví dụ: khả năng sinh hormone), kiểm tra tác động của các yếu tố bên ngoài (ví dụ: thuốc, các vi phân tử hoặc đại phân tử), nghiên cứu phát sinh hình thái, biệt hoá và chức năng của các cơ quan.

3.4. Nuôi cấy tạo mô hoặc cơ quan

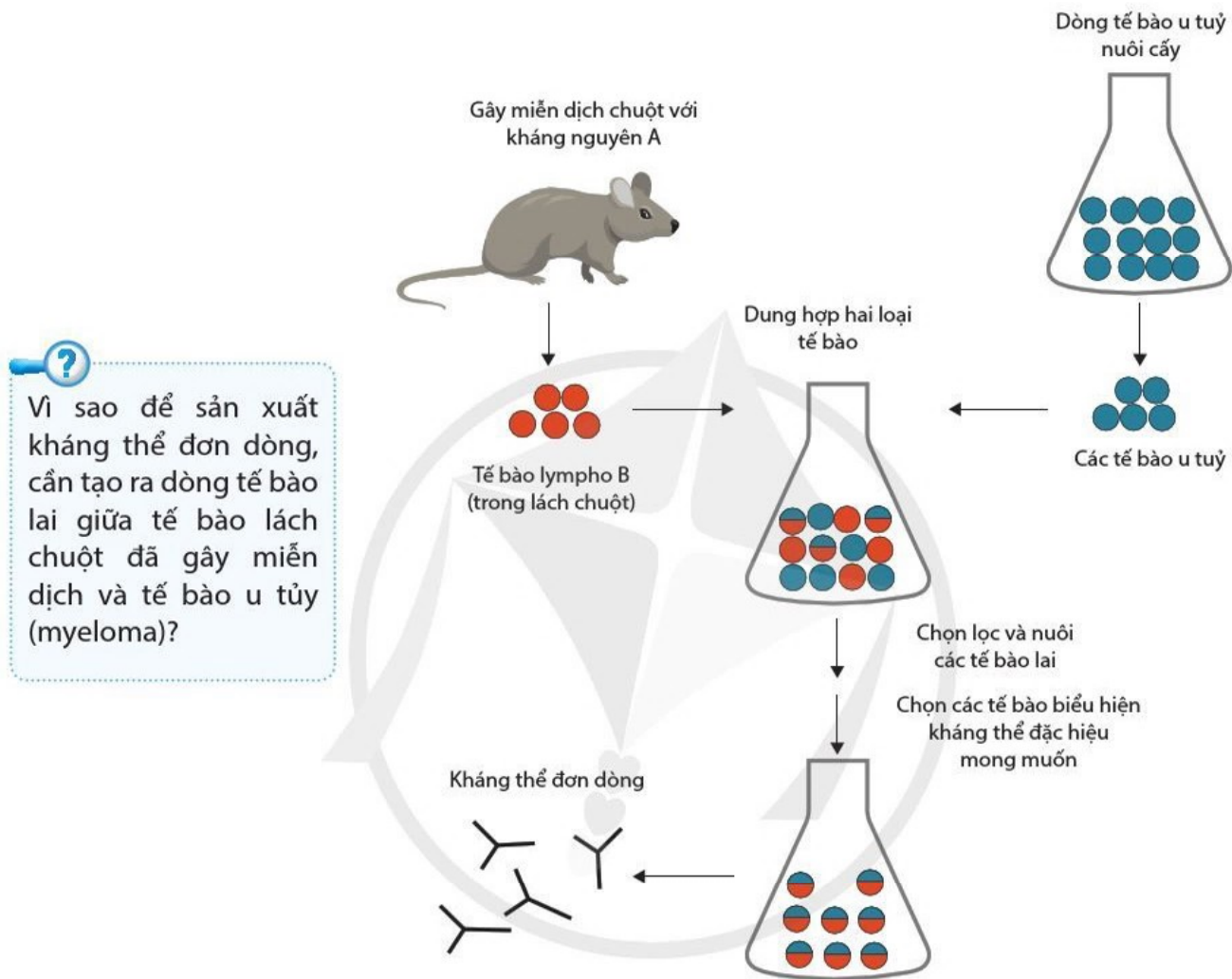
Các kiểu nuôi cấy huyền phù hoặc đơn lớp tế bào (nuôi cấy 2D) nhằm tăng sinh tế bào, nhưng không hình thành tương tác giữa các tế bào và tương tác giữa tế bào với chất nền (matrix). Do đó, tái lập cấu trúc 3D là phương pháp nuôi cấy để các tế bào được nuôi cấy sắp xếp lại và tạo nên các cấu trúc tương tự cơ quan trong cơ thể. Hình 5.3 minh họa ba hướng phát triển mô hình nuôi cấy tế bào 3D, bao gồm (A) Tạo khối tế bào: các tế bào đơn từ các dòng tế bào hoặc dịch nuôi sơ cấp có thể tập hợp thành các cấu trúc 3D; (B) Đồng nuôi cấy kiểu cơ quan: các lát cắt mô từ cơ quan được nuôi ngoài cơ thể; (C) Nuôi cấy tạo các cơ quan thu nhỏ: các tế bào sơ cấp được tách từ mô mới được nuôi trực tiếp ở dạng các cấu trúc đa bào 3D.



Hình 5.5. Ba mô hình nuôi cấy mô tế bào 3D

II. VÍ DỤ VỀ QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT: SẢN XUẤT KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG

Tế bào nuôi cấy có thể được sử dụng như những nhà máy sản xuất các protein đặc thù. Sản xuất kháng thể đơn dòng là một ứng dụng thực nghiệm của công nghệ tế bào động vật (hình 5.6). Kháng thể đơn dòng là protein có khả năng liên kết đặc hiệu chỉ với một protein kháng nguyên, do đó được sử dụng cho nghiên cứu và ứng dụng trong y học.



?
 Vì sao để sản xuất kháng thể đơn dòng, cần tạo ra dòng tế bào lai giữa tế bào lách chuột đã gây miễn dịch và tế bào u tủy (myeloma)?

Hình 5.6. Các bước trong quy trình sản xuất kháng thể đơn dòng bằng nuôi cấy tế bào

Nuôi cấy sơ cấp tế bào lympho B và tạo tế bào lai

Tế bào lympho B bình thường sinh kháng thể nhưng có tuổi thọ hữu hạn khi nuôi cấy *in vitro*. Để sản xuất kháng thể đơn dòng, cần tạo ra dòng tế bào lympho B sinh kháng thể có tính bất tử. Bằng cách dung hợp (lai) tế bào lympho B bình thường từ động vật đã được gây miễn dịch với các tế bào u tủy (các tế bào lympho biến đổi trở nên bất tử không tạo kháng thể), tế bào lai (hybridoma) được tạo ra có đặc tính mới. Trong thực tế, khi dung hợp tế bào u tủy với tế bào lympho B từ lá lách chuột được gây đáp ứng miễn dịch với protein kháng nguyên đặc thù (kháng nguyên A), tế bào lai tạo thành có khả năng tăng sinh vô hạn và sản xuất kháng thể đơn dòng mong muốn.

Tách và chọn lọc các tế bào lai

Tế bào lai (tế bào dung hợp) lẫn trong hỗn hợp chứa các tế bào bố mẹ và các tế bào dung hợp không phù hợp. Quá trình tách các tế bào lai được thực hiện bằng cách nuôi hỗn hợp các tế bào này trong môi trường chọn lọc. Khi đó, chỉ các tế bào lai sinh trưởng được nhờ các đặc điểm mới của chúng, còn tế bào lympho B hay tế bào ung thư tủy ban đầu không thể sinh trưởng được.

Nuôi cấy tế bào và kiểm tra kháng thể đơn dòng

Phản ứng đặc hiệu giữa kháng thể đơn dòng và protein kháng nguyên (A) cho biết kháng thể đã được tạo ra và biểu hiện kháng thể đơn dòng.

Sản xuất kháng thể đơn dòng

Tế bào lai được nuôi cấy với quy mô lớn để tạo ra lượng lớn kháng thể đơn dòng. Để sản xuất quy mô lớn, nuôi cấy được thực hiện trong trong dịch nuôi ở bình phản ứng sinh học có thể tích lớn.



1. Hãy nêu các loại mẫu mô tế bào động vật được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro*. Mỗi loại mẫu này được sử dụng với mục đích gì?
2. Mục đích của việc nuôi cấy thứ cấp tế bào động vật là gì?
3. Hãy vẽ sơ đồ tóm tắt quy trình thực hiện nuôi cấy mô và nuôi cấy cơ quan động vật.
4. Nêu các ứng dụng của nuôi cấy mảnh mô và nuôi cấy cơ quan.



Tìm kiếm thông tin về một số sản phẩm được sản xuất theo quy trình công nghệ tế bào động vật.



- Công nghệ tế bào động vật gồm các giai đoạn chính: chuẩn bị mẫu và môi trường nuôi cấy; tiến hành nuôi cấy theo các giai đoạn nuôi cấy sơ cấp, nuôi cấy thứ cấp và áp dụng các kỹ thuật nuôi cấy mẫu khác nhau theo mục đích định sẵn; giai đoạn thu nhận sản phẩm là phát triển các dòng tế bào, tạo cơ quan hoặc sản xuất các sản phẩm khác.
- Quy trình công nghệ tế bào ứng dụng trong sản xuất kháng thể đơn dòng bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào lympho B, nuôi cấy tế bào u tủy, tạo và chọn lọc tế bào lai bất tử, nuôi cấy tế bào lai và kiểm tra, biểu hiện và thu nhận kháng thể đơn dòng.

Bài 6 CÔNG NGHỆ TẾ BÀO GỐC VÀ ỨNG DỤNG

Học xong bài học này, em có thể:

- Nêu được khái niệm của tế bào gốc.
- Trình bày được một số thành tựu trong nghiên cứu và ứng dụng công nghệ tế bào gốc.
- Thực hiện được dự án tìm hiểu về thành tựu của công nghệ tế bào gốc.



Năm 1981, lần đầu tiên các nhà khoa học phát hiện các tế bào gốc phôi từ phôi chuột giai đoạn sớm. Đến năm 1998, các tế bào mầm phôi của phôi nang lần đầu được phân lập và nuôi cấy trong phòng thí nghiệm. Năm 2006, các nhà nghiên cứu đã tìm ra điều kiện cho phép một số loại tế bào soma ở người trưởng thành có thể trở về trạng thái giống như tế bào gốc.

Những khám phá nêu trên về tế bào gốc phôi mở ra những triển vọng nào trong nghiên cứu và ứng dụng của công nghệ tế bào gốc, đặc biệt trong lĩnh vực y học?

I. KHÁI NIỆM VỀ TẾ BÀO GỐC ĐỘNG VẬT

1. Định nghĩa và đặc điểm của tế bào gốc

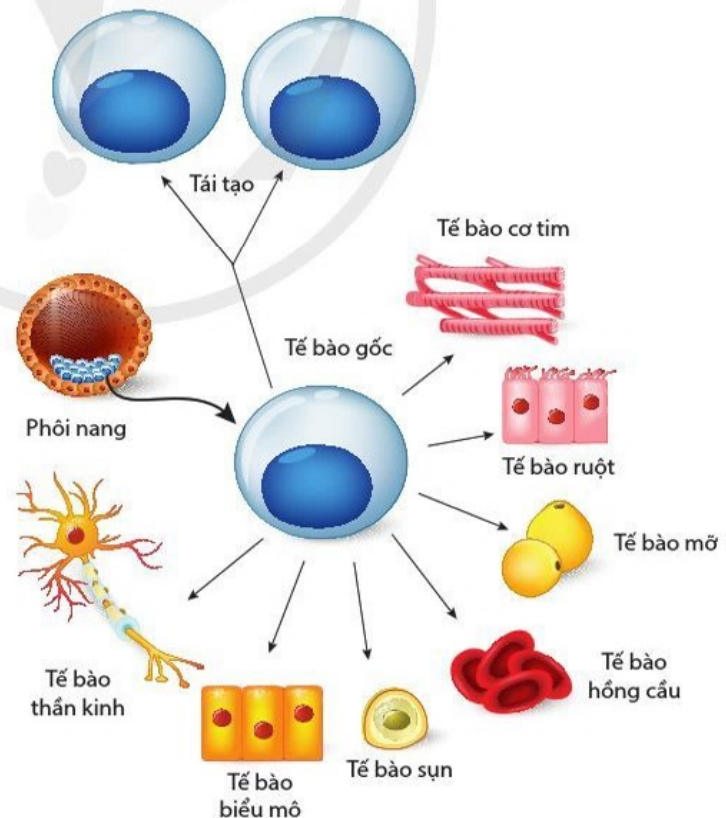


Quan sát hình 6.1 và cho biết:

1. Tế bào gốc có những đặc điểm nào?
2. Các đặc điểm của tế bào gốc có ý nghĩa như thế nào đối với sự phát triển cơ thể và tiềm năng ứng dụng?



Tế bào gốc có thể phân chia và biệt hoá thành những loại tế bào nào?



Hình 6.1. Khả năng tái tạo và biệt hoá thành các loại tế bào khác nhau của tế bào gốc

Tế bào gốc (stem cell) là tế bào chưa được biệt hoá, có thể phân chia tạo ra các tế bào biệt hoá cấu thành các mô và cơ quan của cơ thể động vật, thực vật.

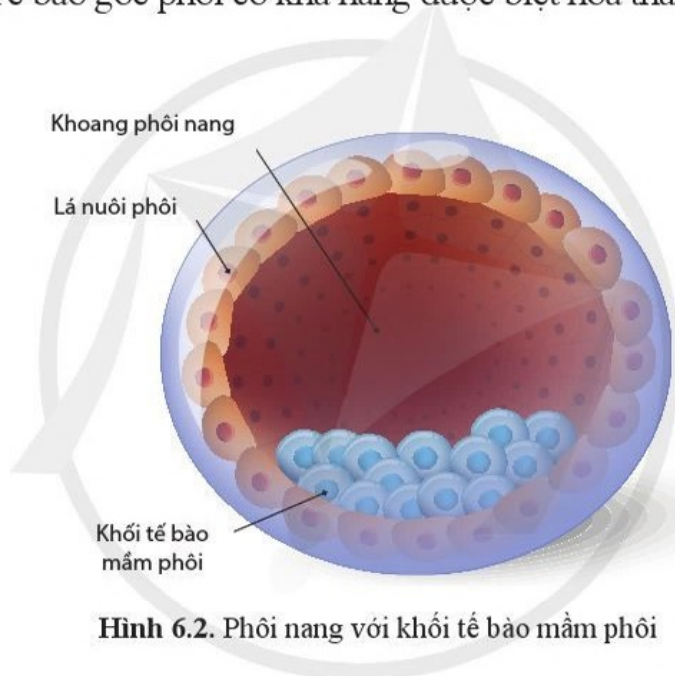
Các loại tế bào gốc đều có hai đặc điểm (hình 6.1):

- Khả năng tự tái tạo: Các tế bào gốc tăng trưởng và phân chia (tăng sinh) tạo nên các tế bào gốc thế hệ con.
- Khả năng biệt hoá thành các loại mô và tế bào của cơ thể: Dưới sự điều hoà của các phân tử truyền tin, các tế bào gốc có thể biệt hoá thành các loại tế bào chuyên biệt như da, cơ, xương, tế bào máu,...

2. Các loại tế bào gốc

Dựa vào nguồn gốc hình thành, tế bào gốc được chia thành hai loại cơ bản: tế bào gốc phôi và tế bào gốc trưởng thành.

Tế bào gốc phôi: là các tế bào bắt nguồn từ khối tế bào mầm phôi của phôi nang ở giai đoạn tiền làm tổ (hình 6.2). Tế bào gốc phôi có khả năng được biệt hoá thành hầu hết các loại mô và cơ quan của cơ thể.



Hình 6.2. Phôi nang với khối tế bào mầm phôi

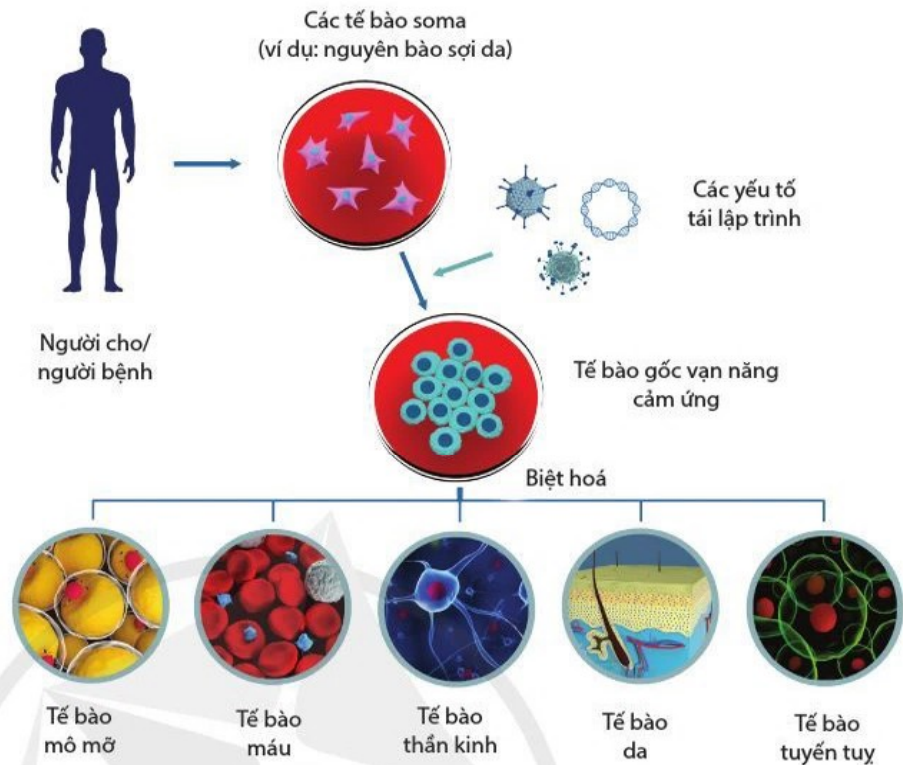
Tế bào gốc trưởng thành (còn được gọi là tế bào gốc mô): là những tế bào chưa được biệt hoá trong các mô hoặc cơ quan của cơ thể sau khi sinh ra, thường có ở một số vị trí nhất định. Loại tế bào gốc này vẫn duy trì trạng thái chưa phân chia trong thời gian dài cho đến khi chúng được hoạt hoá bởi nhu cầu duy trì và sửa chữa mô của cơ thể. Trong quá trình sống, tập hợp các tế bào gốc trưởng thành đóng vai trò là hệ thống sửa chữa bên trong, giúp thay thế các tế bào bị chết do quá trình già hoá, tổn thương hoặc bệnh.



Trong hai loại tế bào gốc (tế bào gốc phôi và tế bào gốc trưởng thành), loại nào có khả năng biệt hoá hình thành nhiều loại mô hơn? Vì sao?

Em có biết

Ngoài phôi nang, mô hoặc cơ quan của cơ thể, tế bào gốc có thể được thu nhận từ dịch màng ối người, tế bào máu cuống rốn, mô ung thư hoặc có thể được tái tạo từ tế bào đã biệt hoá ở các mô soma khác. Tế bào gốc ung thư được phân lập và nuôi cấy nhằm ứng dụng nghiên cứu ung thư, thử thuốc và điều trị ung thư. Tế bào gốc vạn năng cảm ứng (iPSC) là các tế bào gốc được tạo thành bằng việc chuyển một số gene mã hoá yếu tố phiên mã vào tế bào soma đã biệt hoá. Khám phá về các iPSC của Yamanaka Shinya và cộng sự (2006) đã mở ra hướng đi mới cho công nghệ tế bào gốc nhằm tạo tế bào gốc từ tế bào soma, từ đó biệt hoá tạo nên các tế bào của mô thần kinh, cơ tim,... (hình 6.3).



Hình 6.3. Các bước tạo tế bào gốc vạn năng cảm ứng và biệt hoá tế bào chuyên hoá

Tìm hiểu thêm

Các mức độ biệt hoá của tế bào gốc

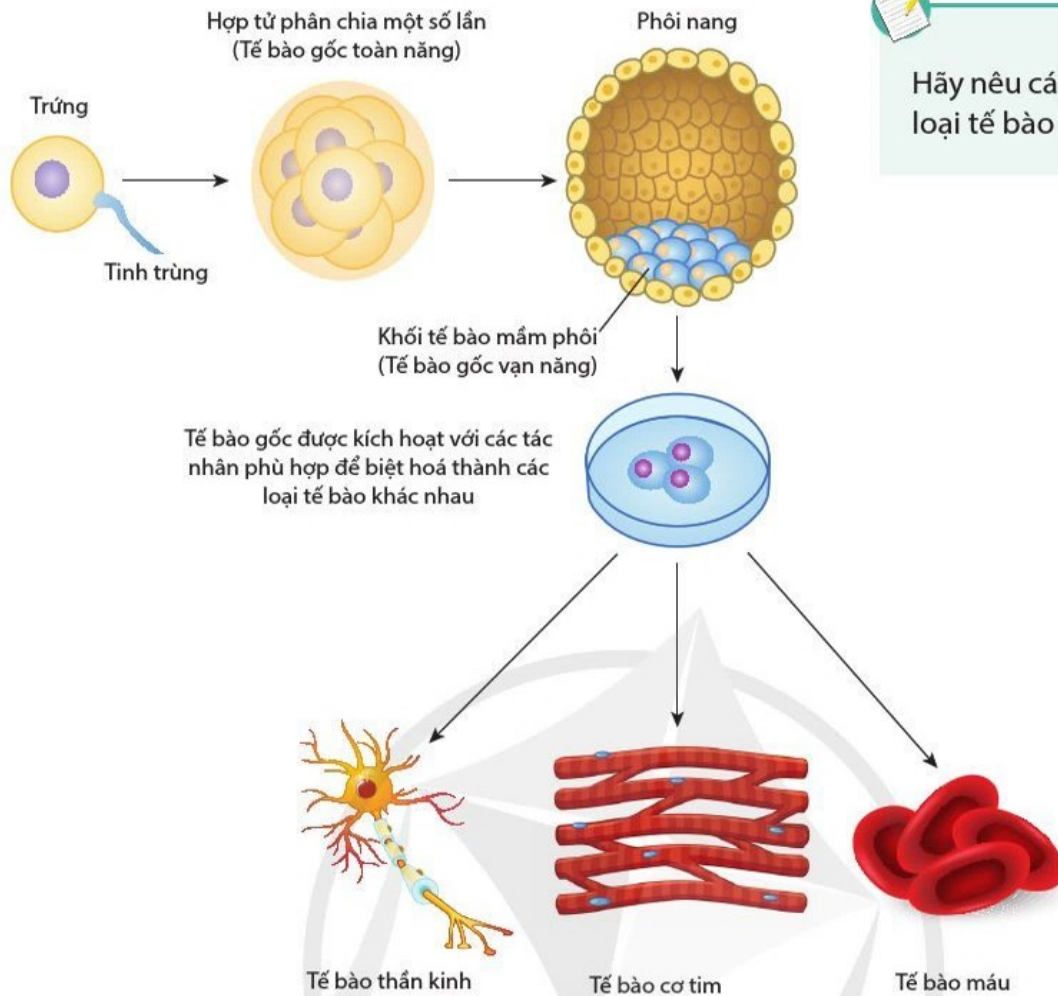
Tùy khả năng biệt hoá thành nhiều hay ít loại tế bào chuyên biệt khác nhau, tế bào gốc có thể là dạng toàn năng, vạn năng, đa năng,...

Các tế bào gốc toàn năng (totipotent) là các tế bào có khả năng tái tạo và biệt hoá thành bất kì loại tế bào nào trong cơ thể. Trứng đã thụ tinh và các tế bào phôi sau một vài lần phân chia đầu tiên từ hợp tử cũng có tính toàn năng.

Các tế bào gốc vạn năng (pluripotent) là các tế bào gốc bắt nguồn từ khối tế bào mầm phôi (tế bào gốc phôi), có thể biệt hoá thành một trong hàng trăm loại tế bào của cơ thể trưởng thành dưới những điều kiện đặc thù (hình 6.4).

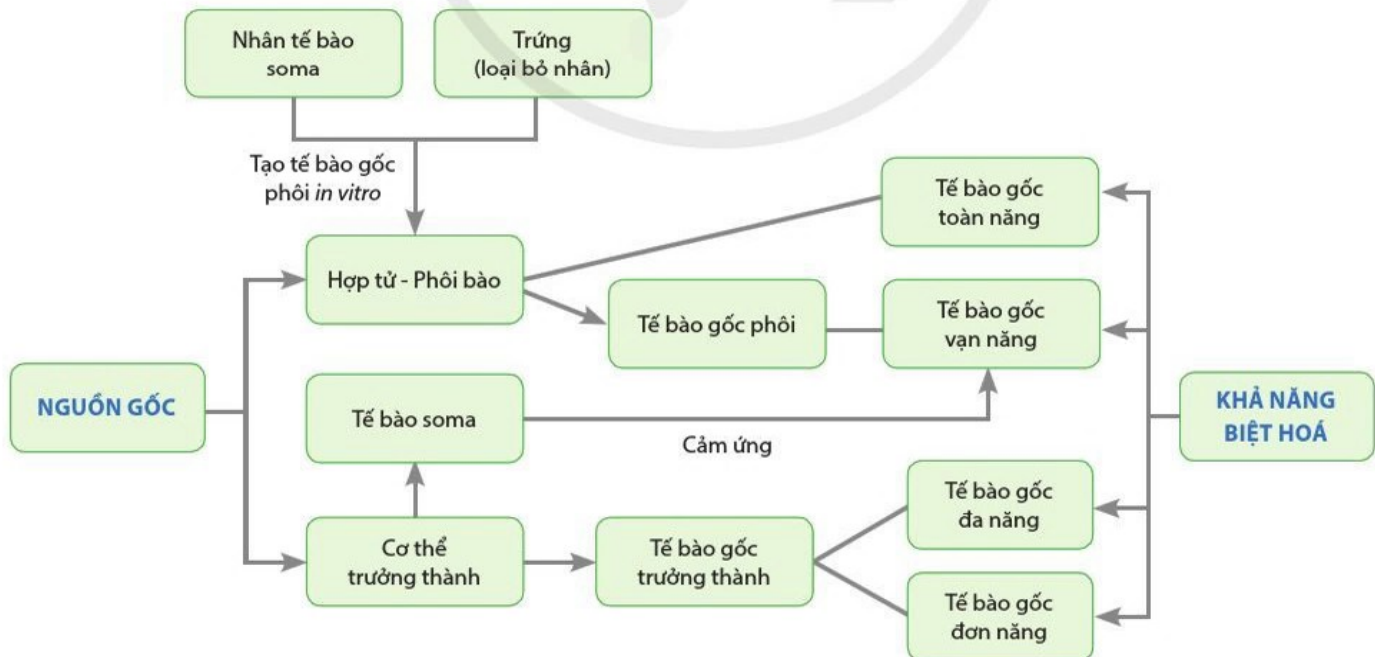
Tế bào gốc đa năng (multipotent) là các tế bào có khả năng biệt hoá thành một số loại tế bào nhưng ít hơn so với tế bào gốc vạn năng và phụ thuộc vào vị trí. Các tế bào gốc trưởng thành như các tế bào gốc tạo máu trong tủy xương là tế bào gốc trưởng thành, đa năng, có thể hình thành thành các tế bào hồng cầu và bạch cầu.

Tế bào gốc đơn năng (unipotent) là tế bào gốc có khả năng biệt hóa thành một loại tế bào và có khả năng tái tạo. Ví dụ: tế bào gốc đơn năng là tế bào gốc dòng mầm (tạo giao tử), tế bào gốc biểu bì (tạo nên da). Đây còn được gọi là các tế bào tiền thân.

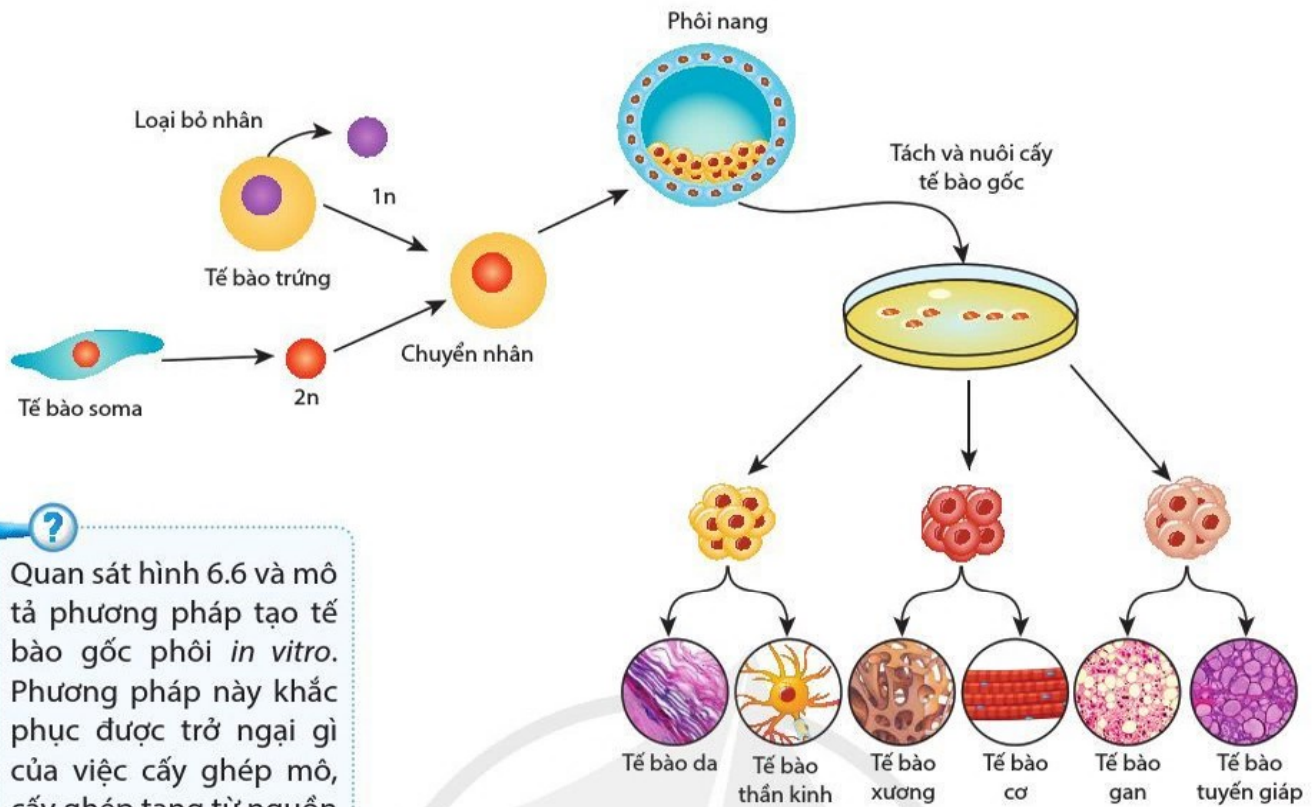


Hãy nêu các tiêu chí phân loại tế bào gốc.

Hình 6.4. Nguồn gốc của tế bào gốc toàn năng và tế bào gốc vạn năng



Hình 6.5. Sơ đồ phân loại tế bào gốc dựa trên: nguồn gốc và khả năng biệt hoá



Hình 6.6. Chuyển nhân từ tế bào soma vào trứng để tạo tế bào gốc phôi và hình thành các mô khác nhau

? Quan sát hình 6.6 và mô tả phương pháp tạo tế bào gốc phôi *in vitro*. Phương pháp này khắc phục được trở ngại gì của việc cấy ghép mô, cấy ghép tạng từ nguồn khác? Giải thích?

? Hãy kể một số thành tựu của công nghệ tế bào gốc và đánh giá vai trò của các thành tựu đó về mặt khoa học và thực tiễn.

? Nếu lấy phôi nang được tạo ra bằng cách chuyển nhân tế bào soma vào trứng đã loại nhân để cấy vào tử cung của cá thể khác, hoặc tách thành nhiều phôi rồi cấy các phôi đó vào tử cung để tiếp tục phát triển, người ta thu được kết quả gì?

II. THÀNH TỰU CỦA CÔNG NGHỆ TẾ BÀO GỐC

Trong những năm gần đây, nghiên cứu và ứng dụng công nghệ tế bào gốc đạt được những thành tựu to lớn, phản ánh qua số lượng các công bố khoa học và thử nghiệm lâm sàng sử dụng liệu pháp tế bào gốc. Các nhà khoa học đánh giá tiềm năng to lớn của công nghệ này khi thị trường toàn cầu về liệu pháp tế bào gốc có thể đạt giá trị hàng chục tỉ đô la Mỹ trong những năm sắp tới.

1. Tái tạo mô lành cho trị liệu

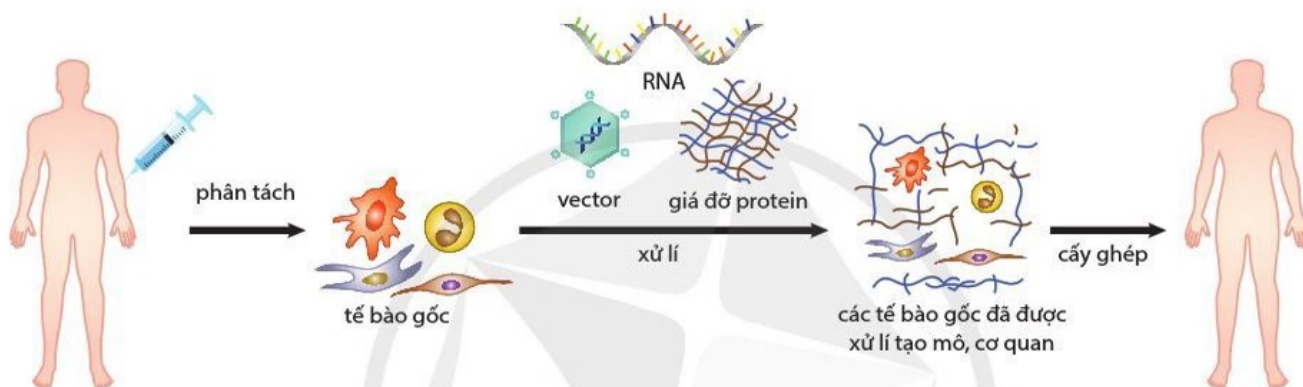
Tái tạo mô bằng công nghệ tế bào gốc được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi để thay thế các mô, cơ quan bị tổn thương hoặc bị bệnh. Thành tựu nổi bật của công nghệ tế bào gốc là tạo được mô trị liệu từ chính các tế bào của người bệnh (mô tự thân) thông qua tế bào gốc vạn năng cảm ứng. Nhờ đó, nguy cơ loại thải mô cấy ghép được giảm thiểu do tính tương hợp mô được đáp ứng. Năm 2007, các nhà khoa học đã thành công trong việc tạo các tế bào gốc vạn năng cảm ứng đặc thù cho từng bệnh nhân bằng tạo các iPSC từ tế bào da người (nguyên bào sợi da) và biệt hoá để tạo các mô khác nhau, sau đó cấy

ghép trở lại bệnh nhân. Các tế bào gốc vạn năng được biệt hoá thành các tế bào beta như ở tuyến tụy có thể khắc phục được sự thiếu hụt nguồn mô trị liệu cho điều trị bệnh đái tháo đường type I.

Công nghệ tế bào gốc sử dụng tế bào gốc phôi là cơ sở của y học tái tạo. Nhờ đó, các mô không có sẵn nguồn cho cấy ghép như mô thần kinh cũng có thể được tái tạo và sử dụng trong điều trị các tổn thương ở não. Khả năng tái tạo mô thần kinh bằng công nghệ tế bào gốc tạo ra triển vọng chữa trị các bệnh liên quan đến hệ thần kinh ở người, chẳng hạn bệnh Parkinson.



Vì sao cấy ghép mô được tạo thành bằng công nghệ tế bào gốc có thể giảm nguy cơ loại thải mô cấy ghép so với các phương pháp cấy ghép mô từ nguồn khác?



Hình 6.7. Quy trình công nghệ tế bào gốc sử dụng các vật liệu sinh học trong tái tạo mô ứng dụng trong cấy ghép mô trị liệu

Tế bào gốc trung mô là các tế bào gốc được phân lập từ một số mô như mô mỡ, tuỷ xương, amidan, ... có tiềm năng tự tái tạo và biệt hoá thành các tế bào tạo mỡ, cơ, tế bào sụn và nguyên bào xương. Do có các đặc tính của tế bào gốc, cùng với chức năng điều hoà miễn dịch và kích thích tăng sinh mạch, các thử nghiệm lâm sàng tế bào gốc trung mô được tiến hành trong điều trị nhiều bệnh như tim mạch, xương, bệnh về hệ thần kinh và các bệnh viêm nhiễm. Trên thị trường hiện nay đã có các sản phẩm trị liệu được sản xuất dựa vào tế bào gốc trung mô.



Công nghệ tế bào gốc phôi trong trị liệu và công nghệ tế bào trong nhân bản vô tính động vật có điểm gì giống nhau và khác nhau?

2. Cấy ghép tế bào gốc

Cấy ghép tế bào gốc trưởng thành hoặc tế bào gốc máu cuống rốn có thể thay thế các tế bào bị tổn thương do điều trị ung thư hoặc tế bào bị bệnh được áp dụng hỗ trợ điều trị một số loại bệnh ung thư và các bệnh liên quan đến máu, như bệnh bạch cầu, ung thư hạch, u nguyên bào thần kinh, ... Liệu pháp tiêm tế bào gốc tuỷ xương có thể khôi phục khả năng miễn dịch cho bệnh nhân bị tổn thương tế bào miễn dịch do hoá trị



Nêu những khó khăn, thách thức có thể gặp phải trong ứng dụng công nghệ tế bào gốc để điều trị bệnh ở người.



1. Theo em, công nghệ tế bào gốc có thể gặp những trở ngại nào? Vì sao?
2. Cần có những lưu ý gì trong nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ tế bào gốc?

ung thư hoặc các bệnh liên quan đến máu. Gần đây, các thử nghiệm lâm sàng được tiến hành để kiểm tra tính an toàn và hiệu quả của cây ghép tế bào gốc phôi trong điều trị nhiều bệnh như tổn thương tủy sống, thoái hoá điểm vàng do lão hoá, đái tháo đường và các bệnh tim mạch.

Những trở ngại trong ứng dụng công nghệ tế bào gốc

Bên cạnh những ưu điểm hứa hẹn, nhiều trở ngại vẫn cần được khắc phục khi ứng dụng tế bào gốc trong trị liệu. Các tế bào gốc phôi có thể tạo thành các tế bào không tương thích với bệnh nhân và bị thải loại khi được cấy ghép. Ngoài ra, kích thích tế bào gốc biệt hoá thành loại tế bào mong muốn khó đạt hiệu quả 100 %, do đó mô được cấy ghép vẫn chứa các tế bào chưa được biệt hoá và có thể phát triển thành những khối mô bất thường.

Mặc dù tế bào gốc phôi đặc biệt có giá trị cho nghiên cứu và ứng dụng thực tiễn do tính vạn năng của chúng, song sử dụng tế bào gốc phôi người để nghiên cứu gây tranh cãi liên quan đến đạo đức sinh học. Trong quá trình tạo dòng tế bào gốc phôi, việc phá hủy phôi nang có thể gây nên sự chỉ trích của xã hội. Do đó, việc ứng dụng tế bào gốc phôi trong lâm sàng bị trì hoãn.

Sử dụng tế bào gốc trưởng thành có thể giúp thực hiện các nghiên cứu y học và tránh được tranh cãi liên quan đến đạo đức. Tuy nhiên, các tế bào này có lượng nhỏ và khó phân lập, chỉ có thể biệt hoá tạo ra một vài loại tế bào xác định, không có tính vạn năng như các tế bào gốc phôi. Khi sử dụng các tế bào được biệt hoá có nguồn gốc từ tế bào gốc vạn năng cảm ứng có thể hình thành khối u ác tính do các yếu tố tái lập trình thường liên quan tới sự phát triển khối u.



- Hãy lập bảng so sánh nguồn gốc và khả năng biệt hoá khác nhau của các loại tế bào gốc động vật. Nêu ứng dụng của mỗi loại tế bào gốc động vật này.
- Ngoài những ứng dụng trong điều trị bệnh ở người, công nghệ tế bào gốc còn có tiềm năng được ứng dụng trong những lĩnh vực nào khác của đời sống? Hãy tìm hiểu về các sản phẩm ứng dụng được sản xuất bằng công nghệ tế bào gốc.

III. THỰC HIỆN ĐỀ TÀI TÌM HIỂU CÁC THÀNH TỰU CỦA CÔNG NGHỆ TẾ BÀO GỐC

1. Mục tiêu

- Thu thập được tài liệu khoa học về các thành tựu của công nghệ tế bào gốc được ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau của thực tiễn đời sống;
- Viết được báo cáo tổng quan về các thành tựu của công nghệ tế bào gốc và ứng dụng;
- Trình bày được báo cáo về thành tựu của công nghệ tế bào gốc.

2. Nội dung tìm hiểu

- Thành tựu, ứng dụng của công nghệ tế bào gốc trong y học (điều trị các bệnh ở người);
- Thành tựu của công nghệ tế bào gốc trong sản xuất dược phẩm;
- Thành tựu của công nghệ tế bào gốc trong tạo giống, nhân giống vật nuôi.

3. Chuẩn bị

- Máy tính kết nối internet;
- Sách, tạp chí khoa học đã xuất bản (ở dạng bản in hoặc bản điện tử).

4. Tiến hành

- Học sinh chia nhóm, làm việc độc lập kết hợp làm việc nhóm;
- Thảo luận để lập đề cương báo cáo, phân công nhiệm vụ cho các thành viên trong nhóm;
- Tìm kiếm thông tin từ cơ sở dữ liệu khoa học được công bố trên các website có nguồn chính thống về mặt khoa học, bài báo khoa học có số xuất bản, các trang tin khoa học của các viện nghiên cứu,...
- Tìm hiểu thực tiễn: hoạt động nghiên cứu và ứng dụng công nghệ tế bào gốc ở địa phương nơi em ở (nếu có);
- Tập hợp kết quả, thảo luận trong nhóm để thống nhất và viết báo cáo theo đề cương;
- Hoàn chỉnh báo cáo.

5. Báo cáo kết quả

- Trình bày báo cáo và thảo luận chung cả lớp;
- Viết tập san thu hoạch kết quả thực hiện đề tài tìm hiểu về công nghệ tế bào gốc.



- Tế bào gốc là các tế bào chưa được biệt hoá, có khả năng tái tạo và biệt hoá thành các tế bào của mô, cơ quan trong cơ thể sinh vật. Các tế bào gốc có thể bắt nguồn từ phôi hoặc từ cơ thể trưởng thành và có khả năng biệt hóa khác nhau.
- Công nghệ tế bào gốc có tiềm năng ứng dụng lớn trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt trong y học tái tạo để điều trị bệnh ở người. Cấy ghép tế bào gốc và tái tạo mô lành để cấy ghép mô là những thành tựu nổi bật của công nghệ tế bào gốc.
- Thành tựu của công nghệ tế bào gốc có những đóng góp quan trọng trong các lĩnh vực như y học, sản xuất dược phẩm, tạo giống và nhân giống vật nuôi.

ÔN TẬP CHUYÊN ĐỀ 1

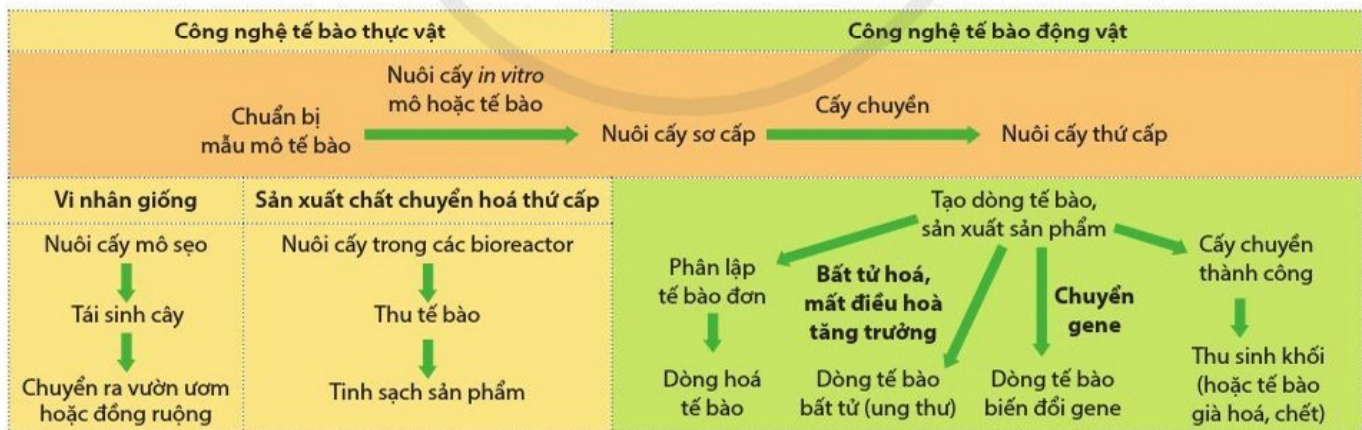
CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ MỘT SỐ THÀNH TỰU

I. TÓM TẮT NỘI DUNG

KHÁI QUÁT VỀ CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ ỨNG DỤNG

Nguyên lí cơ sở của công nghệ tế bào	Tính toàn năng của tế bào	<ul style="list-style-type: none"> Tế bào gốc toàn năng Tế bào gốc vạn năng Tế bào gốc đa năng Tế bào đơn năng 	Thành tựu và ứng dụng của công nghệ tế bào (thực vật và động vật)	
	Khả năng sinh trưởng và phát triển của mô tế bào trong môi trường <i>in vitro</i>			
Kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào	Dựa vào tiến trình nuôi cấy	<ul style="list-style-type: none"> Nuôi cấy sơ cấp Nuôi cấy thứ cấp 	<ul style="list-style-type: none"> – Phát triển kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào – Tạo và cải tiến năng suất, chất lượng giống vật nuôi, cây trồng – Bảo tồn nguồn gene – Phát triển dòng tế bào, mô nuôi cấy cho nghiên cứu 	
	Dựa vào mẫu mô, tế bào nuôi cấy	<ul style="list-style-type: none"> Nuôi cấy tế bào đơn Nuôi cấy mảnh mô Nuôi cấy cơ quan Nuôi cấy phôi bào 		
	Dựa vào mục đích nuôi cấy	Tạo mô, cơ quan (biệt hoá)		Sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp
		Tạo mô sẹo		
		Tạo và nuôi cấy tế bào trần		
	Dựa vào kiểu sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy	Tạo phôi soma		Công nghệ tế bào gốc động vật: <ul style="list-style-type: none"> – Cấy ghép tế bào gốc – Tái tạo mô lành – Nghiên cứu, phát triển thuốc
Tạo tế bào gốc phôi				
Tạo tế bào vạn năng cảm ứng				
		<ul style="list-style-type: none"> Cấy chuyển phôi Nuôi cấy huyền phù tế bào Nuôi cấy đơn lớp 		

CÁC GIAI ĐOẠN CỦA CÔNG NGHỆ TẾ BÀO



II. CÂU HỎI

1. Nêu một số thành tựu nổi bật của công nghệ tế bào và những ý nghĩa của các thành tựu đó đối với đời sống của con người.
2. Trình bày quan điểm của em về những lợi ích và những vấn đề có thể nảy sinh liên quan đến sự phát triển của công nghệ tế bào hiện đại (sức khỏe, kinh tế, xã hội, đạo đức, ...).

Bài 7 CƠ SỞ KHOA HỌC VÀ MỘT SỐ THÀNH TỰU CỦA CÔNG NGHỆ ENZYME

Học xong bài học này, em có thể:

- Phân tích được cơ sở khoa học ứng dụng công nghệ enzyme.
- Trình bày được một số thành tựu của công nghệ enzyme.



Ô nhiễm rác thải nhựa hiện nay đang là vấn đề nan giải toàn cầu do loại rác thải này không phân huỷ hoặc có thời gian phân huỷ dài hàng trăm năm. Hình 7.1 mô phỏng mong muốn của các nhà khoa học tìm ra loại sinh vật có khả năng phân huỷ hoặc tái tạo rác thải nhựa.

Năm 2005, Rudolf Muller và cộng sự lần đầu tiên báo cáo về cutinase, một enzyme ngoại bào từ xạ khuẩn ưa nhiệt *Thermobifida fusca* có khả năng thuỷ phân nhựa tổng hợp từ dầu mỏ (PET – polyethylene terephthalate). Từ đó đến nay, cutinase đã được phát hiện ở nhiều vi sinh vật khác nhau.



Hình 7.1. Mô phỏng vi sinh vật có khả năng phân huỷ rác thải nhựa

Làm thế nào để ứng dụng được enzyme cutinase trong thực tiễn? Nêu các cơ sở khoa học ứng dụng công nghệ enzyme.

I. CƠ SỞ KHOA HỌC ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYME

1. Công nghệ enzyme

Công nghệ enzyme là ngành công nghệ sản xuất các chế phẩm enzyme và ứng dụng chúng trong các lĩnh vực khác nhau.

Chế phẩm enzyme là sản phẩm chứa enzyme có hoạt tính được phối hợp với các chất phụ gia để bảo quản enzyme. Chế phẩm enzyme có thể được sản xuất từ vi sinh vật và dịch chiết tế bào, mô, cơ quan, cơ thể thực vật hoặc động vật.

Để đánh giá chất lượng một chế phẩm enzyme, người ta thường dùng các thông số sau:



Sản phẩm đầu ra của công nghệ enzyme là gì? Nêu một vài ví dụ về sản phẩm của công nghệ enzyme mà em biết.

– *Hoạt độ của enzyme* là lượng enzyme cần thiết để chuyển hoá một lượng cơ chất đặc hiệu thành sản phẩm trong một đơn vị thời gian ở điều kiện phản ứng xác định. Hoạt độ của enzyme thường được tính bằng đơn vị hoạt tính AU (Activity Unit) hoặc đơn vị quốc tế IU (International Unit).

– *Hoạt độ riêng của enzyme* là hoạt độ của enzyme trong một đơn vị khối lượng tính bằng miligam hoặc gam chế phẩm protein enzyme (Ví dụ: 5 IU/mg). Hoạt độ riêng cho phép so sánh mức độ tinh khiết (độ tinh sạch) của các chế phẩm enzyme cùng loại.

2. Cơ sở khoa học ứng dụng công nghệ enzyme



Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của chất xúc tác sinh học (thí nghiệm A) và chất xúc tác hoá học (thí nghiệm B) được thực hiện theo sơ đồ hình 7.2.



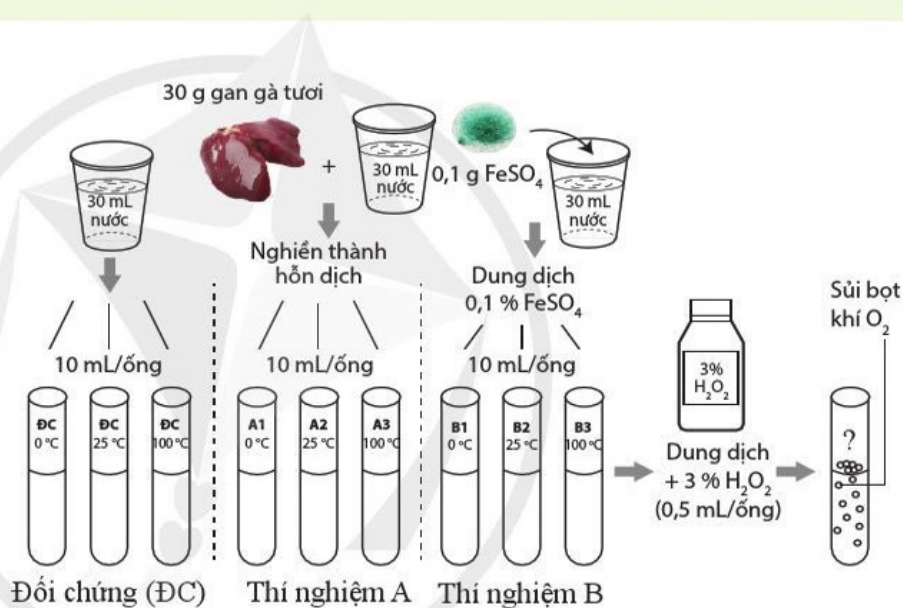
1. Hiện tượng sủi bọt khí trong thí nghiệm A và B xảy ra mạnh nhất ở điều kiện nhiệt độ nào? Dự đoán kết quả theo gợi ý ở bảng 7.1.

Bảng 7.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của chất xúc tác

Nhiệt độ phản ứng	0 °C	25 °C	100 °C
Thí nghiệm A	?	?	?
Thí nghiệm B	?	?	?

2. Đối chứng (ĐC) có hiện tượng sủi bọt không? Tại sao?

3. Tại sao lại có sự khác biệt về ảnh hưởng của nhiệt độ đến kết quả phản ứng phân huỷ H_2O_2 tạo ra khí O_2 trong thí nghiệm A và B nêu trên?



Hình 7.2. Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động của chất xúc tác

Dưới đây là các cơ sở khoa học ứng dụng công nghệ enzyme:

- (1) Enzyme là chất xúc tác sinh học, có nguồn gốc từ sinh vật.
- (2) Enzyme có thể hoạt động bên ngoài tế bào và cơ thể sống trong điều kiện gần với điều kiện trong tế bào của sinh vật đó.
- (3) Enzyme xúc tác chuyển hoá đặc hiệu một hoặc một nhóm cơ chất thành sản phẩm.

- (4) Phần lớn các chế phẩm enzyme hiện nay được sản xuất từ vi sinh vật do chúng có khả năng sinh trưởng nhanh, dễ điều khiển các hoạt động sinh tổng hợp protein.
- (5) Công nghệ enzyme hiện đại gắn liền với việc tìm kiếm, phân lập các enzyme từ vi sinh vật sống trong môi trường cực khắc nghiệt (nhiệt độ, pH, áp suất,... rất cao hoặc rất thấp); đồng thời cải biến đặc tính của các enzyme tự nhiên bằng công nghệ gene để sản xuất các chế phẩm enzyme phục vụ các điều kiện công nghiệp khác nhau (công nghiệp bột giặt và chất tẩy rửa, thuốc da, chế biến giấy, dệt may,...).
- (6) Tùy thuộc vào các ứng dụng khác nhau mà chế phẩm enzyme cần đạt được những yêu cầu khác nhau về đặc tính (điều kiện hoạt động) và chất lượng (hoạt độ, tính đặc hiệu và độ tinh sạch).

II. MỘT SỐ THÀNH TỰU CỦA CÔNG NGHỆ ENZYME

Thành tựu nổi bật của công nghệ enzyme là việc sản xuất enzyme bằng công nghệ DNA tái tổ hợp và cải biến đặc tính của enzyme bằng công nghệ gene.

Hiện nay, hàng loạt các enzyme sử dụng trong công nghiệp (dệt nhuộm, giặt tẩy, thuốc da, chế biến giấy, chế biến thức ăn chăn nuôi, chẩn đoán và điều trị bệnh,...) được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp. Công nghệ này cho phép sản xuất lượng lớn enzyme trong các “nhà máy” vi sinh vật như vi khuẩn *Escherichia coli*, nấm mốc *Aspergillus niger*, nấm men *Sacharomyces cerevisiae*,... Công nghệ này cũng là tiền đề cho các kỹ thuật cải biến đặc tính của các enzyme tự nhiên bằng kỹ thuật gene, nhằm tạo ra các enzyme thích ứng tốt nhất với điều kiện sản xuất ở quy mô công nghiệp, phù hợp với các ứng dụng trong thực tiễn, ví dụ như:

- Chế phẩm chymosin được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp trong *Aspergillus niger*. Chế phẩm này được dùng trong công nghiệp chế biến bơ và phô mai, thay thế cho chế phẩm rennet (rennin), chứa chymosin được sản xuất từ dạ dày bê hoặc cừ non.
- Enzyme Taq DNA-polymerase của vi khuẩn ưa nhiệt *Thermus aquaticus* phân lập từ suối nước nóng đã được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp và ứng dụng trong kỹ thuật nhân đoạn DNA (PCR) để chẩn đoán bệnh và nghiên cứu sinh học phân tử.

Cho đến nay, hàng nghìn chế phẩm enzyme đã được tinh chế từ thực vật, động vật và vi sinh vật để ứng dụng trong nhiều lĩnh vực công nghiệp, nông nghiệp, y dược học, hoá học và nghiên cứu công nghệ sinh học.



1. Quy trình giặt tẩy công nghiệp thường diễn ra ở nhiệt độ cao (50 – 90 °C) và nồng độ các chất tẩy rửa có tính kiềm cao (pH > 8). Enzyme được sử dụng trong công nghiệp bột giặt và chất tẩy rửa cần có những đặc tính gì? Các sinh vật sinh enzyme có đặc tính trên có thể được tìm thấy ở đâu?

2. Chế phẩm enzyme protease dùng trong công nghiệp bột giặt và chất tẩy rửa có khác gì so với chế phẩm enzyme protease dùng trong công nghiệp dược học (Ví dụ: chế phẩm protease dùng để phân giải các cục máu đông gây tắc nghẽn mạch)?



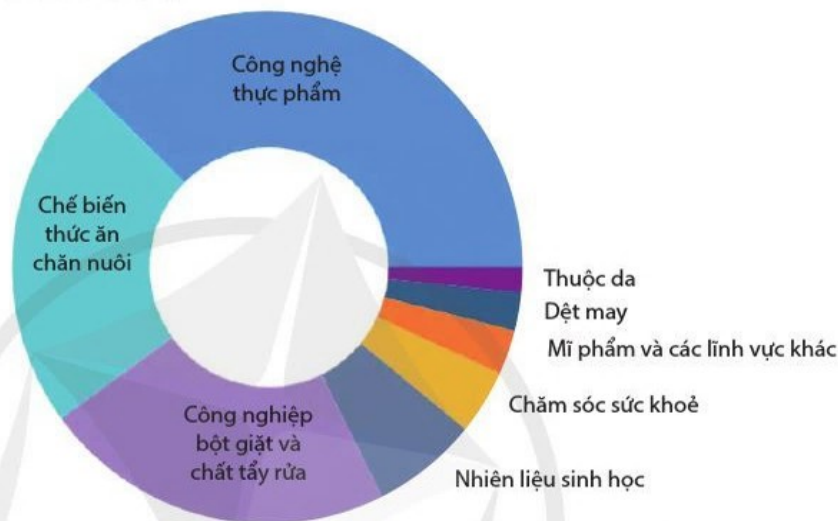
So với động vật và thực vật, vi sinh vật có lợi thế gì khi được dùng để sản xuất chế phẩm enzyme? Nêu tên một số chế phẩm enzyme được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp mà em biết. Chúng được ứng dụng trong lĩnh vực nào?

Thị trường enzyme thế giới năm 2020 được Mordor Intelligence ước tính là khoảng 5,9 tỉ đô la Mỹ, trong đó ba lĩnh vực chính (chiếm trên 75 % doanh thu) là: công nghiệp chế biến thực phẩm, công nghiệp chế biến thức ăn chăn nuôi và công nghiệp giặt tẩy. Phần lớn enzyme phục vụ cho các ngành này là các enzyme tái tổ hợp, chiếm tới 85 %, trong đó, 50 % sản xuất bởi nấm và 35 % sản xuất bởi vi khuẩn; 15 % còn lại là các enzyme được sản xuất từ thực vật như một số enzyme thủy phân protein (papain từ đu đủ, bromelain từ dứa)¹,...

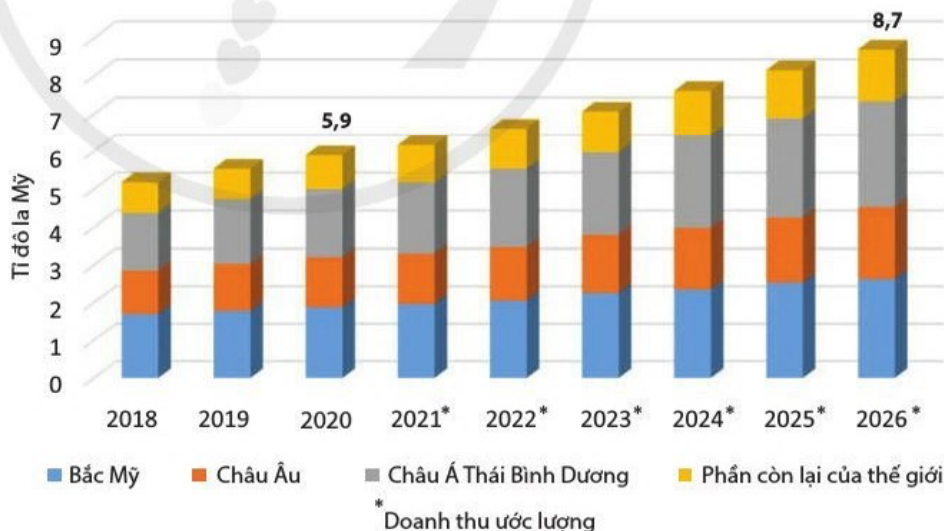
Theo dự đoán của Mordor Intelligence trong báo cáo Dự báo thị trường enzyme công nghiệp giai đoạn 2019 – 2024, sản lượng tiêu thụ enzyme trong công nghiệp liên tục tăng 6,8 % từ năm 2019 đến năm 2024.

Em có biết

Mặc dù có doanh thu cao nhưng các chế phẩm enzyme dùng trong công nghiệp lại không mang lại lợi nhuận cao nhất do các chế phẩm này có giá thành thấp (1 kg chế phẩm enzyme giá vài chục đến vài trăm đô la Mỹ). Trong khi đó, các chế phẩm enzyme dùng trong y dược học lại đem lại lợi nhuận khổng lồ (1 kg chế phẩm enzyme giá hàng tỉ đô la Mỹ) với mức tăng trưởng cực nhanh trong những năm gần đây⁴.



Hình 7.3. Thị trường enzyme (năm 2020) phân chia theo các lĩnh vực ứng dụng²



Hình 7.4. Thị trường enzyme công nghiệp (tính bằng tỉ đô la Mỹ) theo các khu vực trên thế giới³

1 Kocabaş D. S. và Grumet R., 2019, GM Crops & Food 10(4): 191-207, <https://doi.org/10.1080/21645698.2019.1649531>
 2 Mordor Intelligence, <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/industrial-enzymes-market>
 3 Mordor Intelligence, <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>
 4 Puetz J. và Wurm F. M., 2019, Process 7(476): 1-9, DOI:10.3390/pr7080476

Tìm hiểu thêm

Trước khi enzyme đầu tiên được tinh chế (năm 1833), dù chưa biết được bản chất xúc tác của enzyme nhưng con người đã biết sử dụng các sinh vật hoặc bộ phận cơ thể sinh vật chứa enzyme để chuyển hoá cơ chất thành sản phẩm. Ví dụ: sử dụng mầm hạt đại mạch để chuyển hoá tinh bột thành đường; sử dụng nấm men để chuyển hoá đường thành rượu; sử dụng dạ dày cừ non hoặc bê để chuyển hoá protein sữa trong quy trình làm phô mai;...

Năm 1833, enzyme đầu tiên được tinh chế là diastase do nhà hoá học người Pháp Anselme Payen (1795 – 1871) tách chiết từ mầm hạt đại mạch. Năm 1877, lần đầu tiên thuật ngữ “enzyme” được nhà sinh lí học người Đức Wilhelm Kuhne (1837 – 1900) sử dụng để chỉ các chất xúc tác có bản chất sinh học. Cơ chế “chìa khoá – ổ khoá” của phản ứng enzyme được nhà hoá học người Đức Emil Fischer (1852 – 1919) mô tả năm 1894. Mãi đến năm 1926, bản chất protein của enzyme mới được nhà hoá học người Mỹ James Sumner (1887 – 1955) chứng minh thông qua việc kết tinh enzyme urease. Năm 1959, Daniel Koshland Jr. (1920 – 2007) mô tả mô hình “trung tâm hoạt động linh hoạt” (induced fit model) của phản ứng xúc tác bởi enzyme.

Các chế phẩm enzyme bắt đầu được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp (công nghiệp thuộc da năm 1900 và hoá chất tẩy rửa năm 1917). Trong Thế chiến thứ hai, enzyme glucose amylase và penicillin acylase được dùng trong công nghiệp sản xuất penicillin G để điều trị cho thương bệnh binh. Năm 1988, chế phẩm enzyme tái tổ hợp đầu tiên được sản xuất là chymosin, một protease được sản xuất trong *Aspergillus niger* bằng công nghệ DNA tái tổ hợp. Chế phẩm này được dùng trong sản xuất bơ và phô mai.

Tìm hiểu và sắp xếp một số mốc lịch sử quan trọng của ngành công nghệ enzyme vào ba giai đoạn phát triển chính của ngành này (hình 7.5).



Hình 7.5. Các giai đoạn phát triển chính của công nghệ enzyme



- Các cơ sở khoa học ứng dụng công nghệ enzyme: (1) Enzyme là chất xúc tác sinh học; (2) enzyme có thể hoạt động bên ngoài tế bào và cơ thể sống trong điều kiện gần với điều kiện của tế bào và cơ thể sinh ra nó; (3) enzyme xúc tác đặc hiệu; (4) vi sinh vật có ưu thế trong công nghệ sản xuất enzyme; (5) enzyme từ các vi sinh vật cực khắc nghiệt, enzyme được sản xuất và cải biến bằng công nghệ DNA tái tổ hợp và công nghệ gene là xu thế của công nghệ enzyme hiện đại; (6) enzyme được ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau có chất lượng và các đặc tính khác nhau.
- Thành tựu nổi bật của công nghệ enzyme là việc sản xuất enzyme bằng công nghệ DNA tái tổ hợp và cải biến đặc tính của enzyme bằng công nghệ gene.

Bài 8 SẢN XUẤT ENZYME TỰ NHIÊN

Học xong bài học này, em có thể:

- Trình bày được quy trình công nghệ sản xuất enzyme tự nhiên.
- Lấy được một số ví dụ về sản xuất enzyme tự nhiên.



a)



b)

Hình 8.1. Các phương pháp làm mềm thịt (a – sử dụng cơ học; b – sử dụng chế phẩm enzyme)



Tại sao người ta có thể sản xuất enzyme lysozyme từ lòng trắng trứng gà; sản xuất enzyme papain từ đu đủ xanh và sản xuất enzyme bromelain từ dứa?

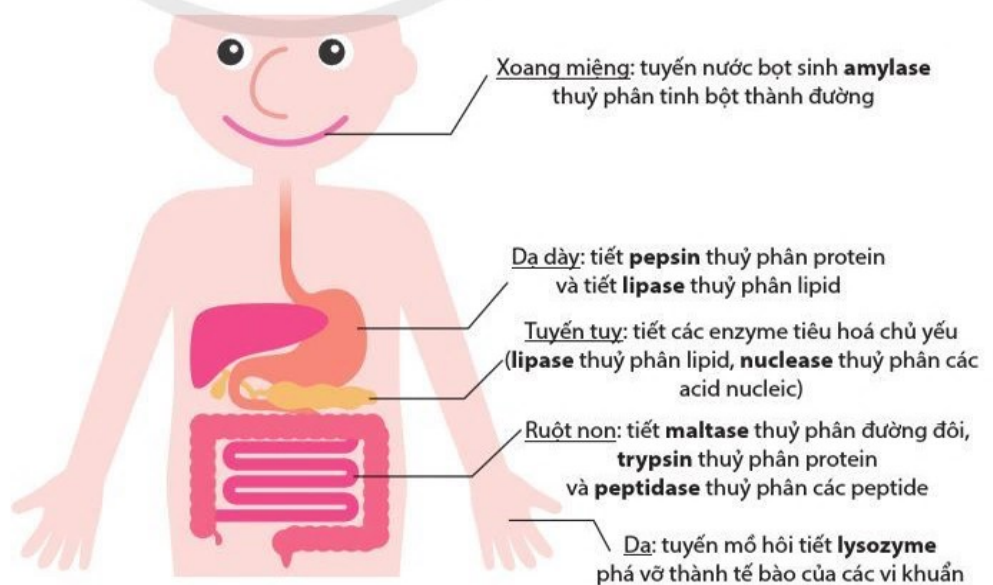


Quan sát hình 8.2 và cho biết: Các enzyme trong hệ tiêu hoá của người có vai trò khác nhau và khác với các enzyme trong hệ thống tiết trên da (ví dụ: tuyến mồ hôi) như thế nào.

Hiện nay, bên cạnh việc làm mềm thịt bằng phương pháp cơ học (hình 8.1 a), người ta còn sử dụng các chế phẩm enzyme làm mềm thịt được chiết xuất từ tự nhiên (hình 8.1 b). Enzyme có thể được sản xuất từ các nguồn nào trong tự nhiên? Vì sao cần sản xuất các chế phẩm enzyme tự nhiên? Enzyme tự nhiên được sản xuất bằng cách nào?

I. NGUỒN ENZYME TỰ NHIÊN

Mọi tế bào, cơ thể sống đều có enzyme vì enzyme tham gia vào hầu hết các phản ứng trao đổi chất và năng lượng của tế bào, nhờ đó sinh vật thực hiện được các chức năng sống (hình 8.2). Tuy nhiên, không phải tất cả các tế bào, mô, cơ quan, bộ phận trong cơ thể sống đều chứa cùng loại và lượng enzyme. Các loài khác nhau có thể sinh các loại enzyme khác nhau cùng nhóm. Ví dụ: cùng sinh enzyme thủy phân protein (nhóm protease) nhưng đu đủ có papain, dứa có bromelain. Tùy từng điều kiện sống khác nhau mà các cá thể khác nhau trong cùng một loài cũng sinh ra loại enzyme và lượng enzyme không giống nhau.



Hình 8.2. Một số enzyme trong cơ thể người

Ba nguồn sản xuất enzyme tự nhiên là: (1) tế bào, mô và cơ thể động vật; (2) tế bào, mô và cơ thể thực vật; (3) vi sinh vật. Để có thể dùng làm nguyên liệu sản xuất enzyme trong công nghệ enzyme, nguồn nguyên liệu tự nhiên phải đáp ứng được các điều kiện sau: chứa lượng lớn enzyme, chi phí thấp, dễ sản xuất; không đối lập với các nhu cầu khác của con người và môi trường; dễ thu hồi, tinh sạch và bảo quản.

Vi sinh vật sinh trưởng, phát triển nhanh trong môi trường nuôi cấy nhân tạo. Rất nhiều vi sinh vật sinh trưởng được trên các môi trường chỉ chứa nguồn carbon rẻ tiền và các khoáng chất đơn giản. Hơn nữa, môi trường sống của vi sinh vật rất đa dạng nên nguồn enzyme của chúng cũng rất phong phú, có những tính chất đặc biệt, phù hợp với các ứng dụng khác nhau của con người mà các enzyme từ thực vật và động vật không có. Đó là những ưu điểm vượt trội của nguồn nguyên liệu khai thác từ vi sinh vật so với nguyên liệu thực vật và động vật trong sản xuất các chế phẩm enzyme tự nhiên.

Chế phẩm enzyme tự nhiên được ứng dụng chủ yếu trong công nghiệp chế biến thực phẩm. Ngoài ra, chúng còn được sử dụng trong công nghiệp mỹ phẩm và dược phẩm.



Nêu các điểm hạn chế của nguồn nguyên liệu động vật và thực vật, so với nguồn nguyên liệu vi sinh vật trong công nghệ sản xuất enzyme từ tự nhiên.

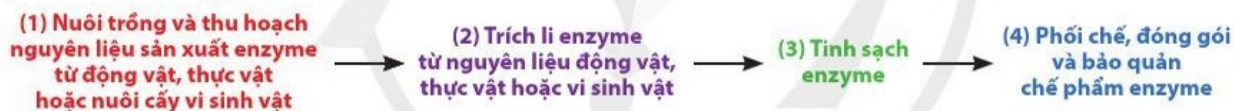


Nêu một số ví dụ ứng dụng trong đời sống liên quan đến các chế phẩm enzyme từ tự nhiên.

II. SẢN XUẤT ENZYME TỰ NHIÊN

1. Quy trình sản xuất enzyme tự nhiên

Các giai đoạn cơ bản trong quy trình sản xuất enzyme tự nhiên được mô tả trong hình 8.3.



Hình 8.3. Sơ đồ tóm tắt quy trình sản xuất enzyme tự nhiên



Quan sát hình 8.4 chỉ ra nguyên tắc chung và các khác biệt giữa quy trình sản xuất enzyme tự nhiên từ động vật, thực vật và vi sinh vật.

Hình 8.4. Sơ đồ tóm tắt các giai đoạn trong quy trình sản xuất enzyme từ động vật, thực vật (a) và từ vi sinh vật (b)

1.1. Nuôi trồng và thu hoạch nguyên liệu động vật, thực vật và nuôi cấy vi sinh vật



Tại sao nguồn nguyên liệu động vật, thực vật sau khi thu hoạch về phải được sử dụng ngay hoặc bảo quản trong điều kiện thích hợp (để lạnh hoặc sấy khô)?



Tại sao công nghệ nuôi cấy bề mặt rắn lại phù hợp để nuôi các vi sinh vật hiếu khí?

Nuôi trồng và thu hoạch nguyên liệu động vật và thực vật

Bước đầu tiên trong quy trình sản xuất enzyme từ tế bào, mô, cơ thể động vật và thực vật là tiến hành nuôi trồng trong các nông trại hoặc đánh bắt, thu hái từ tự nhiên các loài động vật và thực vật làm nguyên liệu để sản xuất enzyme.

Nguồn nguyên liệu sau khi thu hoạch phải được chế biến ngay để tránh mất mát, biến tính enzyme. Nếu chưa thể chế biến ngay, nguồn nguyên liệu này cần được bảo quản trong điều kiện thích hợp (để lạnh hoặc sấy khô) đối với từng loại enzyme.

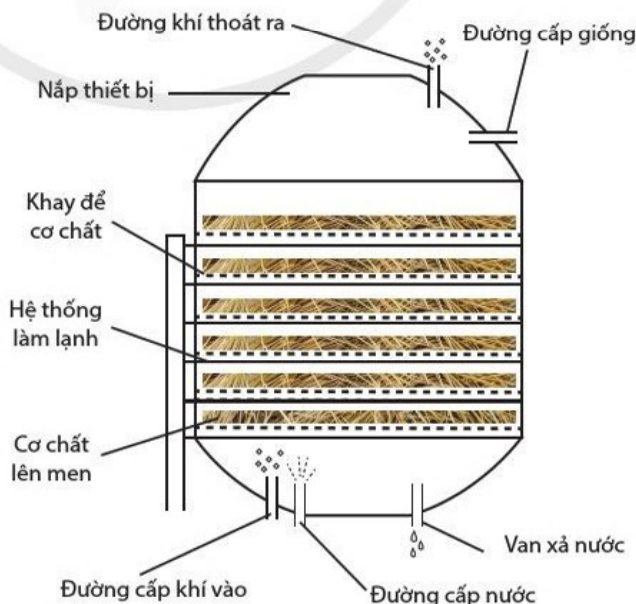
Nuôi cấy vi sinh vật

Sản xuất enzyme từ vi sinh vật có thể thực hiện bằng công nghệ nuôi cấy bề mặt rắn (SSF – Solid State Fermentation) hoặc nuôi cấy chìm (SmF – Submerge Fermentation).

Công nghệ nuôi cấy bề mặt rắn sử dụng các khay đựng cơ chất lên men dạng rắn (hình 8.5). Loại cơ chất này là các phế phẩm phụ phẩm công nghiệp, nông nghiệp như mùn cưa, vỏ trấu, than hoạt tính, rơm, rạ cắt nhỏ,... được thấm dung dịch dinh dưỡng. Cơ chất này vừa là chỗ bám, đồng thời là nguồn thức ăn cho vi sinh vật sinh trưởng, phát triển. Đây là công nghệ nuôi cấy phù hợp đối với các vi sinh vật hiếu khí, có khả năng tận dụng được các phế phẩm, phụ phẩm công nghiệp, nông nghiệp nhưng đòi hỏi diện tích bề mặt lớn, khó đảo trộn đồng đều cơ chất và chỉ nuôi được theo mẻ.

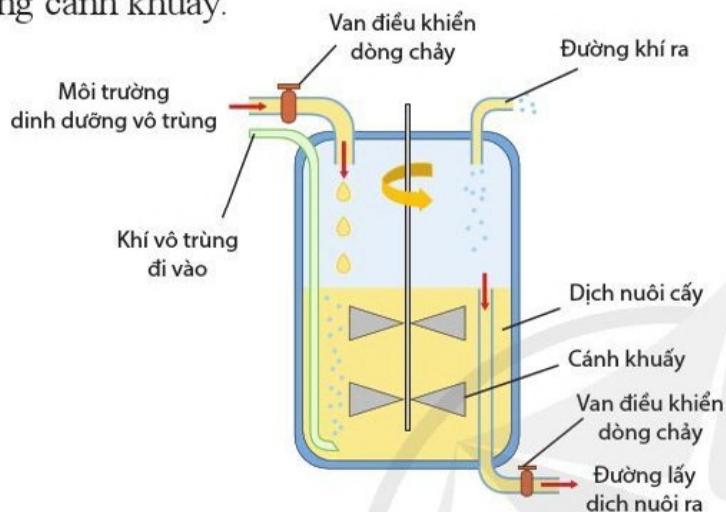


Hãy mô tả một hệ thống nuôi cấy bề mặt rắn mà em biết.



Hình 8.5. Hệ thống nuôi cấy bề mặt rắn

Công nghệ nuôi cấy chìm cho phép nuôi cấy cả vi sinh vật hiếu khí lẫn kỵ khí trong môi trường dịch thể theo kỹ thuật nuôi theo mẻ (không bổ sung thêm chất dinh dưỡng trong suốt quá trình nuôi) hoặc kỹ thuật nuôi cấy liên tục (chất dinh dưỡng được bổ sung và dịch nuôi được lấy ra liên tục với tốc độ dòng chảy như nhau trong suốt quá trình nuôi, hình 8.6). Tuy nhiên, cơ chất (các chất dinh dưỡng) phải được hoà tan trong dung dịch và dịch nuôi cấy được khuấy trộn liên tục bằng cánh khuấy.



Hình 8.6. Hệ thống nuôi cấy chìm liên tục

1.2. Trích li enzyme từ nguyên liệu động vật, thực vật và vi sinh vật

Trích li enzyme từ nguyên liệu động vật và thực vật

Cắt nhỏ và nghiền trong nước là phương pháp thông dụng để trích li enzyme từ tế bào động vật và thực vật. Dịch nghiền thường được lọc qua màng vải để loại bỏ cặn tế bào và thu dịch lọc chứa enzyme. Người ta kết tủa enzyme trong dịch lọc bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hoặc các hoá chất khác để thu hồi chế phẩm enzyme thô (hỗn hợp enzyme và các protein, các thành phần khác của tế bào) cho bước tinh sạch enzyme tiếp theo.

Trích li enzyme từ vi sinh vật

Vi sinh vật có thể sản xuất các enzyme ngoại bào (tiết ra bên ngoài tế bào) và nội bào (có ở bên trong tế bào). Đối với các enzyme ngoại bào, dịch enzyme thô được thu hoạch bằng cách lọc bỏ sinh khối tế bào. Đối với các enzyme nội bào, dịch enzyme thô được trích li từ sinh khối tế bào bằng các phương pháp phá vỡ tế bào khác nhau (phương pháp vật lí: nghiền với bi thủy tinh, thay đổi áp suất dịch tế bào, dùng nhiệt độ để phá vỡ tế bào; phương pháp hoá học: dùng các chất tẩy rửa, các ion gây thay đổi áp suất thẩm thấu trong tế bào,...; hoặc kết hợp với phương pháp sinh học: dùng enzyme để phá vỡ tế bào).



So sánh công nghệ nuôi cấy bề mặt rắn với công nghệ nuôi cấy chìm.



Quan sát hình 8.4 và so sánh các quy trình trích li enzyme ngoại bào với enzyme nội bào từ vi sinh vật.



Nêu các phương pháp phá vỡ tế bào để trích li enzyme nội bào ra khỏi tế bào sinh vật.



Tại sao phải tinh sạch enzyme?



Nêu các kĩ thuật tinh sạch enzyme hiện có.



1. Nêu vai trò của chất phụ gia đối với chế phẩm enzyme.
2. Nêu các cách bảo quản chế phẩm enzyme.

Sau đó, dịch enzyme thô được cô đặc bằng các phương pháp tương tự như đối với dịch lọc enzyme từ sinh khối thực vật, động vật.

1.3. Tinh sạch enzyme tự nhiên

Dịch enzyme trích li từ tế bào hoặc từ môi trường nuôi cấy có thể chứa các thành phần dinh dưỡng, chất thải độc hại từ môi trường nuôi cấy hoặc chứa các thành phần khác nhau trong tế bào động vật, thực vật và vi sinh vật bị phá vỡ. Loại bỏ các thành phần này ra khỏi dung dịch nhằm tinh sạch enzyme là bước quan trọng để thu hồi chế phẩm enzyme.

Căn cứ vào các đặc tính khác nhau của từng enzyme, người ta có thể tinh sạch enzyme qua nhiều bước khác nhau bằng các kĩ thuật sau:

- Dùng các dung môi có ái lực (có khả năng hoà tan và thu hút) với các hợp chất cao phân tử (các polysaccharide, lipid,...) để tách chúng ra khỏi dịch chứa enzyme.
- Dùng các phương pháp sắc kí khác nhau (trao đổi ion, tương tác kỵ nước, ái lực và lọc gel) để tách enzyme ra khỏi dịch chứa enzyme.

Sắc kí là phương pháp phân tách các phân tử khác nhau trong một hỗn hợp dựa trên kích thước của các phân tử hoặc các liên kết (trao đổi ion, kỵ nước, ái lực,...) giữa phân tử cần phân tách với các nhóm chức trên chất mang.

1.4. Phối chế, đóng gói và bảo quản chế phẩm enzyme

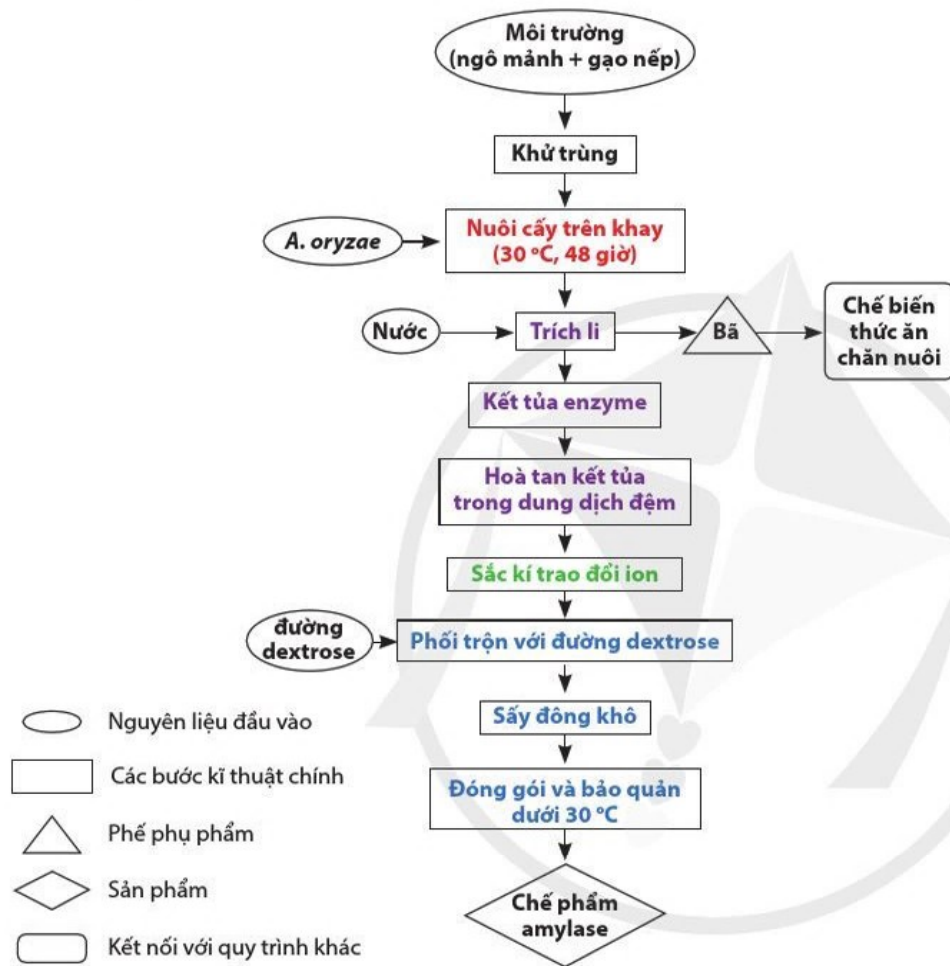
Các chế phẩm enzyme tự nhiên có thể là các chế phẩm enzyme thô (chưa được tinh sạch hoàn toàn, còn chứa enzyme và nhiều thành phần khác) hoặc chế phẩm enzyme tinh sạch (chỉ chứa enzyme). Để có thể giữ được hoạt tính của các enzyme trong chế phẩm, người ta thường bổ sung các chất phụ gia (một số loại đường đơn, đường đôi, polysaccharide hoặc các chất tương thích khác) vào chế phẩm enzyme trước khi đóng gói nhằm đảm bảo sự ổn định về cấu trúc và các đặc tính của enzyme.

Tùy thuộc vào độ bền của enzyme, chế phẩm có thể được sấy khô, sấy phun, sấy đông khô và được đóng gói dạng bột hoặc được giữ trong dung dịch bảo quản và đóng chai. Tùy từng loại chế phẩm enzyme và các ứng dụng khác nhau, điều kiện bảo quản chế phẩm enzyme trước khi đến tay người sử dụng có thể rất khác nhau: bảo quản ở nhiệt độ thường (25 – 30 °C), bảo quản trong điều kiện mát (4 – 10 °C) hoặc ở điều kiện lạnh đông (từ -20 °C đến -30 °C).

2. Ví dụ về quy trình sản xuất enzyme tự nhiên

Amylase là enzyme thuỷ phân tinh bột, được sử dụng nhiều trong công nghiệp chế biến bia, rượu, nước giải khát; chế biến bánh kẹo; công nghiệp giặt tẩy.

Chế phẩm amylase có thể được sản xuất từ vi sinh vật (nấm mốc *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, vi khuẩn *Bacillus subtilis*,...) hoặc từ thực vật (hạt đại mạch hoặc hạt lúa nếp mầm,...).



Quan sát hình 8.7 và cho biết những bước nào trong quy trình sản xuất chế phẩm amylase từ nấm mốc *A. oryzae* tương ứng với bốn giai đoạn cơ bản của quy trình sản xuất enzyme.

Hình 8.7. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm amylase từ nấm mốc *Aspergillus oryzae*



- Chế phẩm enzyme tự nhiên được sản xuất từ động vật, thực vật và vi sinh vật.
- Các giai đoạn cơ bản trong quy trình sản xuất enzyme tự nhiên là: (1) Nuôi, trồng động vật, thực vật hoặc nuôi cấy vi sinh vật sinh enzyme; (2) Trích li enzyme từ nguyên liệu động vật, thực vật hoặc vi sinh vật; (3) Tinh sạch enzyme; (4) Phối chế, đóng gói và bảo quản chế phẩm enzyme.
- Chế phẩm enzyme tự nhiên được ứng dụng chủ yếu trong công nghiệp chế biến thực phẩm, mĩ phẩm và dược phẩm.

Bài 9 SẢN XUẤT ENZYME TÁI TỔ HỢP

Học xong bài học này, em có thể:

- Trình bày được quy trình công nghệ sản xuất enzyme tái tổ hợp.
- Lấy được một số ví dụ về sản xuất enzyme tái tổ hợp.



Hình 9.1. Bổ sung chế phẩm chymosin làm đông tụ sữa trong quy trình làm phô mai

Bổ sung chế phẩm rennet (rennin) chứa enzyme chymosin làm đông tụ sữa là bước quan trọng, không thể thiếu trong quy trình sản xuất phô mai công nghiệp (hình 9.1).

Năm 1960, Tổ chức Lương thực, thực phẩm thế giới (FAO) dự báo sẽ có sự thiếu hụt trầm trọng chế phẩm rennet được sản xuất từ dạ dày bê hoặc cừ non, dùng trong chế biến phô mai. Chế phẩm rennet thô từ một dạ dày bê hoặc cừ non sẽ đủ để đông tụ khoảng 340 – 450 lít sữa, tạo thành 45,4 – 88,6 kg phô mai tùy loại. Tuy nhiên, việc sản xuất chế phẩm rennet từ dạ dày của bê hoặc cừ non để đáp ứng nhu cầu chế biến phô mai buộc người ta phải sử dụng rất nhiều bê hoặc cừ non (1 tấn phô mai cần sử dụng từ 11 – 22 con bê hoặc cừ non). Có cách nào để khắc phục được điều đó không? Công nghệ enzyme có thể làm gì để tránh được sự thiếu enzyme chymosin cho sản xuất phô mai?

I. ENZYME TÁI TỔ HỢP

?

Enzyme tái tổ hợp là gì?
Tại sao người ta cần sản xuất enzyme tái tổ hợp?

Enzyme tái tổ hợp là enzyme được sinh tổng hợp từ phân tử DNA tái tổ hợp đã được chuyển vào tế bào sinh vật chủ. Trong đó, phân tử DNA tái tổ hợp là phân tử DNA có từ hai nguồn gốc trở lên, một phần của phân tử DNA tái tổ hợp là từ vector chuyển gene (thể truyền) và phần còn lại là DNA từ các sinh vật có nguồn gene mã hoá protein enzyme đích.

Phần lớn các enzyme tái tổ hợp được sản xuất trong tế bào chủ là các vi sinh vật do hệ gene của chúng nhỏ, đã được nghiên cứu kỹ, dễ điều khiển sinh tổng hợp protein đích. Các vector chuyển gene ở vi sinh vật cũng rất đa dạng, sẵn có và được nghiên cứu đầy đủ. Hơn thế nữa, nhiều vi sinh vật sinh trưởng nhanh trong môi trường nuôi cấy nhân tạo, không đòi hỏi nguồn dinh dưỡng đất tiên nên hiệu suất sinh tổng hợp protein enzyme cao. Các vi sinh vật điển hình dùng trong sản xuất protein tái tổ hợp là *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*,...



Vi sinh vật có ưu thế gì so với tế bào động vật và thực vật khi chúng là tế bào chủ để sản xuất enzyme tái tổ hợp?

Một số enzyme (có nguồn gốc từ động vật và thực vật) có cấu trúc bậc 2, 3 hoặc 4 phức tạp, có nhiều tiểu phần, nhiều cầu nối disulfide hoặc có gắn với coenzyme, cofactor, gắn các gốc đường,... thường khó sản xuất trong tế bào chủ là vi sinh vật. Do vậy, chúng thường được sản xuất trong các dòng tế bào chủ động vật hoặc thực vật.



Những enzyme nào cần sản xuất trong dòng tế bào chủ động vật hoặc thực vật?

II. SẢN XUẤT ENZYME TÁI TỔ HỢP

1. Quy trình sản xuất enzyme tái tổ hợp

Các giai đoạn cơ bản trong quy trình sản xuất enzyme tái tổ hợp được mô tả trong hình 9.2.

(1) Tạo dòng DNA tái tổ hợp mang gene mã hoá enzyme

(2) Chuyển DNA tái tổ hợp vào dòng tế bào chủ thích hợp cho biểu hiện gene

(3) Biểu hiện gene và thu hồi enzyme tái tổ hợp

(4) Tinh sạch enzyme tái tổ hợp

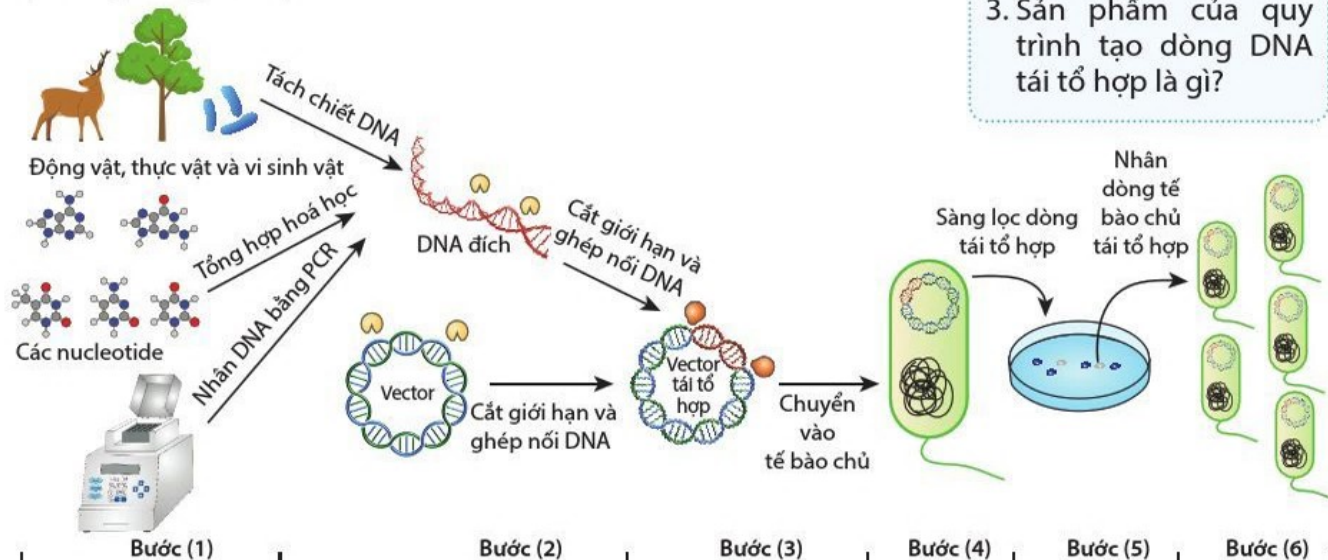
(5) Phối chế, đóng gói và bảo quản chế phẩm enzyme tái tổ hợp

Hình 9.2. Sơ đồ tóm tắt quy trình sản xuất enzyme tái tổ hợp

1.1. Tạo dòng DNA tái tổ hợp mang gene mã hoá enzyme

Bước (1): Gene hay đoạn DNA mã hoá enzyme đích (enzyme cần sản xuất) có thể được tách chiết hoặc tổng hợp bằng các phương pháp khác nhau.

Bước (2): Vector (thể truyền) và DNA đích được cắt bằng cùng loại enzyme giới hạn.



Hình 9.3. Sơ đồ tóm tắt các bước tạo dòng DNA tái tổ hợp



So sánh các giai đoạn cơ bản trong quy trình sản xuất enzyme tái tổ hợp (hình 9.2) với các giai đoạn cơ bản trong quy trình sản xuất enzyme tự nhiên (hình 8.3).



Quan sát hình 9.3 và cho biết:

1. Đoạn DNA hay gene đích được lấy từ những nguồn nào?
2. Sản phẩm ghép nối gene đích với vector là gì?
3. Sản phẩm của quy trình tạo dòng DNA tái tổ hợp là gì?

Bước (3): Ghép nối vector và đoạn DNA đích đã được cắt giới hạn bằng enzyme nối để tạo vector (DNA) tái tổ hợp.

Bước (4): Chuyển vector tái tổ hợp vào tế bào chủ.

Bước (5): Sàng lọc, tuyển chọn dòng tế bào chủ mang vector tái tổ hợp.

Bước (6): Nhân dòng tế bào mang vector tái tổ hợp.

1.2. Chuyển DNA tái tổ hợp vào dòng tế bào chủ thích hợp cho biểu hiện gene

DNA tái tổ hợp sau khi được nhân lên với số lượng bản sao lớn trong tế bào vi khuẩn cần được chuyển vào dòng tế bào biểu hiện thích hợp (động vật, thực vật hoặc vi sinh vật) bằng các phương pháp khác nhau. Các dòng tế bào tái tổ hợp này cung cấp các điều kiện đầy đủ, thuận lợi cho gene mã hoá enzyme được biểu hiện.

1.3. Biểu hiện gene và thu hồi enzyme tái tổ hợp

Dòng tế bào chủ tái tổ hợp cần được nhân lên số lượng lớn trước khi được kích hoạt biểu hiện gene. Khi mật độ tế bào đạt đến mức tối ưu, quá trình biểu hiện gene đích thành protein enzyme được kích hoạt bằng các hoá chất khác nhau (đường lactose, ethanol, methanol,...) hoặc các điều kiện vật lý, hoá học thay đổi (pH, nhiệt độ,...) tùy theo từng loại vector và tế bào chủ biểu hiện gene.

Enzyme tái tổ hợp có thể được sinh tổng hợp, được giữ lại bên trong tế bào chủ (enzyme nội bào) hoặc được tiết ra bên ngoài tế bào (enzyme ngoại bào). Do vậy, các phương pháp, kỹ thuật dùng trong trích li và thu hồi enzyme tái tổ hợp cũng giống như đối với enzyme tự nhiên.

1.4. Tinh sạch enzyme tái tổ hợp

Enzyme tái tổ hợp thường được tinh sạch bằng sắc ký ái lực để sử dụng trong công nghiệp chế biến thực phẩm, mỹ phẩm, chăn nuôi,... Nếu sử dụng làm thuốc, enzyme tái tổ hợp cần được tinh chế để có độ tinh khiết cao.

1.5. Phối chế, đóng gói và bảo quản chế phẩm enzyme tái tổ hợp

Trước khi đóng gói, chất phụ gia (một số loại đường đơn, đường đôi, polysaccharide hoặc các chất tương thích khác) được bổ sung vào chế phẩm enzyme nhằm đảm bảo ổn định đặc tính của enzyme.

Chế phẩm enzyme tái tổ hợp có thể được cô đặc hoặc sấy khô, sấy phun, sấy đông khô và được đóng gói dạng bột hoặc được giữ trong dung dịch bảo quản và đóng chai. Điều kiện bảo quản chế phẩm enzyme khác nhau tùy vào đặc tính của enzyme và yêu cầu ứng dụng enzyme đó.



Nhân dòng tế bào tái tổ hợp lên số lượng lớn trước khi được kích hoạt biểu hiện gene nhằm mục đích gì?



Nêu các cách thức dùng để kích hoạt dòng tế bào chủ biểu hiện gene.

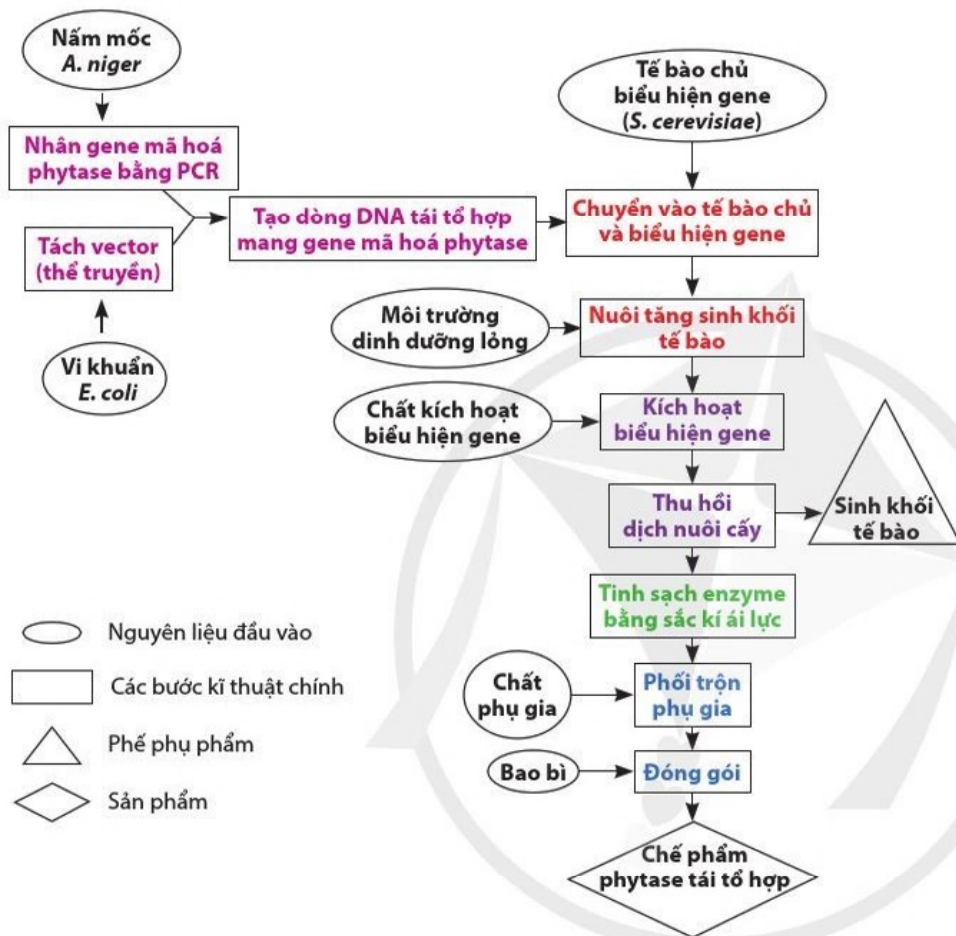


Tại sao chế phẩm enzyme tái tổ hợp dùng làm thuốc cần được tinh chế để có độ tinh khiết cao?

2. Ví dụ về quy trình sản xuất enzyme tái tổ hợp

Phytase là enzyme được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi để hỗ trợ tiêu hoá cho động vật nuôi, giảm thiểu ô nhiễm môi trường do phân thải.

Chế phẩm phytase đã được sản xuất tái tổ hợp trong các vi sinh vật chủ như nấm mốc *Aspergillus niger*, vi khuẩn *Escherichia coli*, nấm men *Saccharomyces cerevisiae*,...



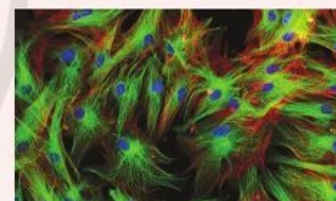
Hình 9.4. Sơ đồ quy trình sản xuất phytase tái tổ hợp trong *S. cerevisiae*



Quan sát hình 9.4 và cho biết những giai đoạn nào trong quy trình sản xuất chế phẩm phytase tái tổ hợp tương ứng với năm giai đoạn cơ bản của quy trình sản xuất enzyme tái tổ hợp.

Em có biết

Bằng phương pháp tái tổ hợp gene, người ta có thể gắn các protein phát huỳnh quang (với các màu khác nhau) vào các enzyme trong các cấu trúc khác nhau của tế bào. Nhờ đó, người ta có thể quan sát được vị trí hoạt động, sự dịch chuyển của các enzyme này trong tế bào sống dưới kính hiển vi huỳnh quang.



Hình 9.5. Tế bào có các protein phát huỳnh quang



- Enzyme tái tổ hợp là enzyme được sinh tổng hợp từ phân tử DNA tái tổ hợp đã được chuyển vào tế bào sinh vật chủ.
- Các giai đoạn cơ bản trong quy trình sản xuất enzyme tái tổ hợp là: (1) Tạo dòng DNA tái tổ hợp mang gene mã hoá enzyme; (2) Chuyển DNA tái tổ hợp vào dòng tế bào chủ thích hợp cho biểu hiện gene; (3) Biểu hiện gene và thu hồi enzyme tái tổ hợp; (4) Tinh sạch enzyme tái tổ hợp; (5) Phối chế, đóng gói và bảo quản chế phẩm enzyme tái tổ hợp.
- Quy trình sản xuất enzyme tái tổ hợp giúp tạo ra chế phẩm enzyme tái tổ hợp tinh sạch với số lượng lớn, đáp ứng nhu cầu sử dụng trong các lĩnh vực công nghiệp, nông nghiệp và đời sống.

Bài 10 ỨNG DỤNG VÀ TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ ENZYME

Học xong bài học này, em có thể:

- Trình bày được một số ứng dụng của enzyme trong các lĩnh vực: công nghệ thực phẩm, y dược, kỹ thuật di truyền; các loại chế phẩm enzyme được dùng trong các ứng dụng khác nhau.
- Phân tích được triển vọng của công nghệ enzyme trong tương lai.
- Thực hiện được dự án hoặc đề tài tìm hiểu về ứng dụng enzyme.



So với việc sử dụng chất xúc tác hoá học và các tác nhân vật lý, việc sử dụng enzyme trong các quy trình sản xuất và đời sống làm giảm chất thải ô nhiễm môi trường, giúp chúng ta “sống xanh” hơn (hình 10.1). Liệu chúng ta có thể “sống xanh” hơn nữa bằng cách giảm sử dụng, sử dụng lại hoặc tái chế enzyme để giảm thiểu việc tiêu tốn năng lượng, phát thải khí CO₂, nước thải và các phế phụ phẩm cần được xử lý trong quy trình sản xuất enzyme?



Hình 10.1. Khẩu hiệu xanh “Giảm sử dụng, sử dụng lại và tái chế”

I. ỨNG DỤNG ENZYME

1. Ứng dụng các loại chế phẩm enzyme

Nhằm đáp ứng với các nhu cầu ứng dụng khác nhau trong chế biến thực phẩm, xử lý ô nhiễm môi trường, chẩn đoán và điều trị bệnh,... các loại chế phẩm enzyme khác nhau đã được sản xuất: (1) enzyme tự do; (2) enzyme cố định; (3) enzyme trong tế bào.

Ứng dụng chế phẩm enzyme tự do (free enzyme)

Chế phẩm enzyme tự do (còn gọi là enzyme tan) có thể ở dạng bột (được trộn với các chất phụ gia) hoặc dạng dịch (trong dung dịch bảo quản enzyme). Khi hoạt động, các enzyme trong chế phẩm tự do tiếp xúc với cơ chất, không bị giới hạn về không gian; do vậy, chúng thể hiện được đầy đủ hoạt tính của mình. Tuy nhiên, các enzyme tự do rất dễ bị biến tính bởi các điều kiện môi trường (nhiệt độ, pH, các chất ức chế,...).

Các chế phẩm enzyme tự do được dùng phổ biến trong công nghiệp, nông nghiệp và đời sống. Loại chế phẩm này đặc biệt hữu hiệu đối với các cơ chất không tan như cellulose của rơm rạ, trấu, mùn cưa; tinh bột của các loại ngũ cốc; các phế phẩm, phụ phẩm dạng rắn trong công nghiệp chế biến (đầu vỏ tôm, cá, cua, bã sắn,...). Ví dụ: trong sản xuất ethanol sinh học,



Khi nào enzyme được dùng ở dạng (1) tự do, (2) cố định và (3) trong tế bào?



Nêu các ưu điểm, nhược điểm của chế phẩm enzyme tự do.

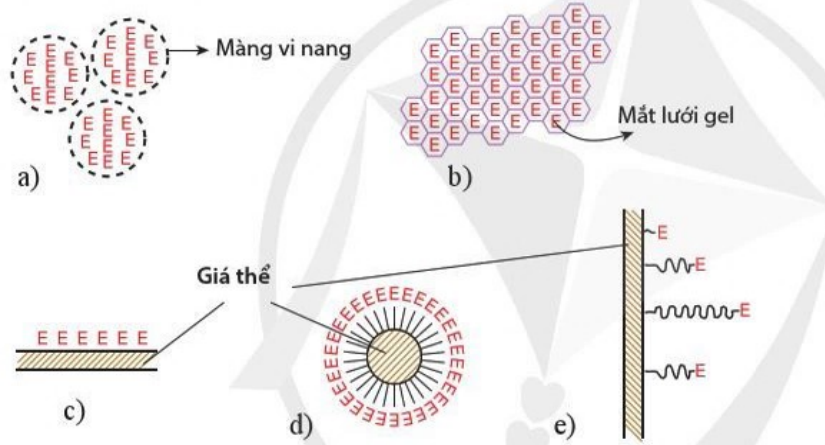
các enzyme cellulase, pectinase, lignin hydrolase, laccase,... được sử dụng để chuyển hoá cellulose, hemicellulose và lignin trong xác thực vật thành hỗn hợp các loại đường để nấm men có thể sử dụng, chuyển hoá thành ethanol.

Ứng dụng chế phẩm enzyme cố định (immobilized enzyme)

Chế phẩm enzyme cố định (còn gọi là enzyme không tan) chứa các phân tử enzyme được giữ hoặc gắn trong một vùng, một khoang cố định của giá thể hay chất mang. Enzyme cố định vẫn giữ được hoạt tính xúc tác nhưng thường không hoà tan vào dung dịch có chứa cơ chất; do vậy, chế phẩm enzyme được tái sử dụng nhiều lần và dễ dàng tách ra khỏi sản phẩm phản ứng.

Enzyme có thể được cố định trong các hạt vi nang (alginate, polyacrylamide,...) hoặc được hấp phụ, gắn trên các giá thể (than hoạt tính, cellulose biến tính, đường dextran,...) bằng các liên kết khác nhau.

?
Người ta có thể tái sử dụng enzyme bằng những cách nào?



Quan sát hình 10.2 và cho biết kỹ thuật cố định enzyme từ (a) đến (e) thuộc loại nào sau đây:
 (1) cố định trong vi nang;
 (2) hấp phụ trên giá thể;
 (3) gắn trên giá thể bằng các liên kết khác nhau.

Hình 10.2. Các kỹ thuật cố định enzyme (chú thích: E – enzyme)

Enzyme cố định hoạt động hiệu quả đối với các cơ chất hoà tan trong dung dịch, các cơ chất đó có thể di chuyển và tiếp xúc enzyme một cách dễ dàng. Ví dụ: penicillin acylase được cố định trên các sợi cellulose acetate hoặc trong các hạt polyacrylamide để sản xuất 6-aminopenicillanic acid (6-APA); glucose isomerase được cố định trên DEAE-cellulose để sản xuất syrup HFCS (hỗn hợp của glucose và fructose).

Bên cạnh đó, enzyme cố định cũng được dùng trong các que thử nhanh, trong các cảm biến sinh học (biosensor). Ví dụ: glucose dehydrogenase được cố định trên que thử đường huyết, alcohol dehydrogenase được cố định trên các cảm biến thử nồng độ cồn trong hơi thở,...

Ứng dụng chế phẩm enzyme trong tế bào (whole-cell enzyme)

Một số sản phẩm chuyển hoá đòi hỏi sự xúc tác của enzyme có gắn với coenzyme hoặc của phức hệ nhiều enzyme phức tạp trong tế bào, đòi hỏi năng lượng ATP. Do vậy, sự chuyển hoá này thường được thực hiện nhờ các enzyme trong tế bào (hình 10.3). Việc sử dụng các enzyme trong tế bào giúp giảm chi phí tinh sạch enzyme, giảm thiểu sự biến tính của enzyme do các tác động của môi trường. Hạn chế của công nghệ này là cơ chất

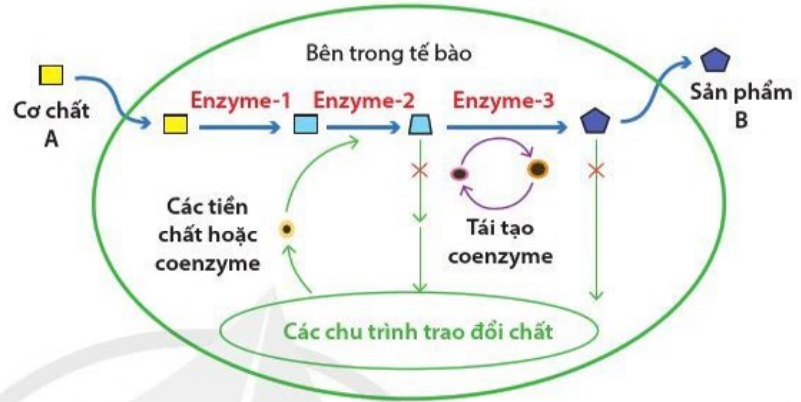


Quan sát hình 10.3 và cho biết: Cơ chất A được chuyển hoá thành sản phẩm B nhờ những enzyme nào trong tế bào? Các enzyme đó cần hỗ trợ gì từ tế bào?



Nêu các ưu điểm và hạn chế của kĩ thuật sử dụng enzyme trong tế bào so với sử dụng enzyme tự do.

cần phải đi qua màng tế bào để vào trong tế bào và sản phẩm cần phải đi qua màng tế bào để ra ngoài môi trường, dẫn đến tốc độ phản ứng enzyme bị chậm lại. Thêm vào đó, việc duy trì sinh trưởng của tế bào trong môi trường cũng gặp khó khăn đối với các vi sinh vật cực khắc nghiệt. Ví dụ: Phức hệ enzyme trong tế bào vi khuẩn *Serratia marcescens* đã được sử dụng để chuyển hoá dầu thực vật thành biodiesel.



Hình 10.3. Chuyển hoá cơ chất thành sản phẩm bằng enzyme trong tế bào

2. Ứng dụng của enzyme trong một số lĩnh vực

Enzyme được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực đời sống và sản xuất. Các lĩnh vực sử dụng nhiều chế phẩm enzyme nhất là: công nghệ thực phẩm, chế biến thức ăn chăn nuôi và công nghiệp bột giặt, chất tẩy rửa. Các lĩnh vực đang phát triển mạnh mẽ, đòi hỏi cung cấp những enzyme có đặc tính mới là: nhiên liệu sinh học, y dược học, chăm sóc sức khoẻ, mỹ phẩm và các nghiên cứu kĩ thuật di truyền.

Ứng dụng của enzyme trong công nghệ thực phẩm

Enzyme được sử dụng trong chế biến thực phẩm từ rất lâu đời. Thống kê về thị trường enzyme năm 2020 cho thấy trên 35 % chế phẩm enzyme được dùng trong chế biến thực phẩm⁵. Nhóm enzyme được sử dụng nhiều nhất là các enzyme thuỷ phân.

Amylase được sản xuất từ vi sinh vật như nấm mốc *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, vi khuẩn *Bacillus subtilis*,... được ứng dụng trong công nghiệp chế biến bánh kẹo, trong làm tương, làm rượu có độ cồn cao.

Các protease cũng được sử dụng nhiều trong công nghệ thực phẩm. Ví dụ: chymosin trong chế biến phô mai; bromelain trong làm mềm thịt và sản xuất nước mắt, nước chấm,...

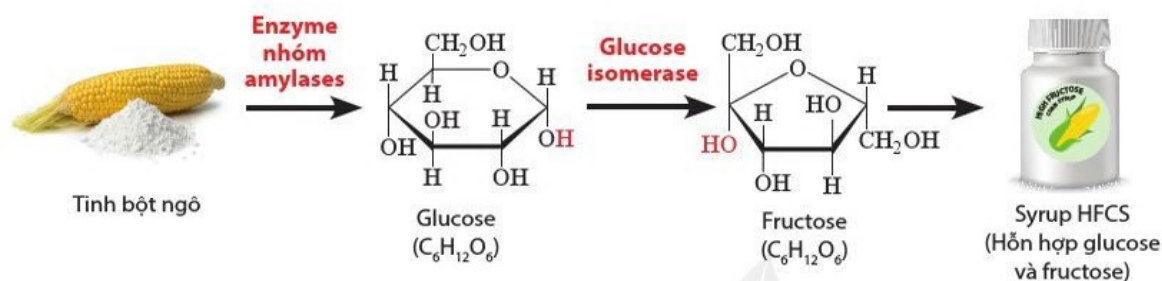


Nêu tên một số chế phẩm enzyme được dùng trong công nghiệp chế biến thực phẩm mà em biết.

Bên cạnh các enzyme thủy phân, các enzyme oxi hoá – khử cũng được dùng trong tạo màu thực phẩm; các enzyme chuyển vị nhóm như glucose isomerase được dùng cùng với amylase trong chế biến syrup HFCS (hỗn hợp của glucose và fructose) từ tinh bột ngô. Syrup HFCS được dùng thay thế cho đường sucrose trong công nghiệp chế biến nước ngọt, bánh kẹo và thực phẩm do có độ ngọt cao hơn và giá thành thấp hơn đường sucrose.



Quan sát hình 10.4 và cho biết các enzyme được sử dụng trong quy trình sản xuất syrup HFCS thực hiện xúc tác các phản ứng nào trong quy trình đó.



Hình 10.4. Sử dụng enzyme nhóm amylases và glucose isomerase trong chế biến syrup HFCS

Ứng dụng của enzyme trong y dược học

Các chế phẩm enzyme được sử dụng trong y dược học thường có độ tinh sạch cao để tránh gây các phản ứng phụ cho người sử dụng. Một số enzyme sử dụng dạng thuốc uống cần được bao bọc trong các hạt vi nang để đảm bảo không bị thủy phân, biến tính bởi các enzyme tiêu hoá và dịch tiêu hoá trước khi đến được vị trí tác dụng.



Đọc bảng 10.1 và cho biết enzyme được dùng trong các ứng dụng nào của ngành y dược.

Bảng 10.1. Một số enzyme được dùng trong y dược học

Tên enzyme	Ứng dụng chính
Aspartase	Sản xuất thuốc: chất tạo ngọt nhân tạo L-aspartate, L-aspartame dùng cho người tiểu đường
Creatine kinase	Chỉ thị, chẩn đoán: chẩn đoán cơn đau tim
Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), alkaline phosphatase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)	Chỉ thị, chẩn đoán: chẩn đoán men gan cao
Hyaluronidase	Hỗ trợ thuốc: tăng tính dẫn thuốc, làm thuốc hấp thụ sâu vào mô cơ thể
Papain	Hỗ trợ tiêu hoá: tăng cường tiêu hoá, chống đầy bụng, khó tiêu
Penicillin acylase	Sản xuất thuốc: sản xuất 6-amino penicillanic acid
Streptokinase, urokinase	Trị liệu: làm tan máu đông gây tắc nghẽn mạch
Trypsin, chymotrypsin và serratiopeptidase	Trị liệu: chống viêm, chống phù nề, sưng tấy



Trong quy trình tạo dòng DNA tái tổ hợp (hình 9.3, bài 9), enzyme được dùng trong những bước nào? Chúng là những enzyme nào? Nêu vai trò xúc tác của các enzyme đó.



Theo em, ngành công nghệ enzyme trong tương lai sẽ tập trung vào các lĩnh vực nào?

Trong sản xuất thuốc kháng sinh, penicillin acylase là enzyme được dùng để xúc tác phản ứng chuyển hoá penicillin G và V tự nhiên thành tiền chất 6-amino penicillanic acid (6-APA). Từ đó, 6-APA được sử dụng trong sản xuất hàng loạt các kháng sinh bán tổng hợp như ampicillin, amoxicillin, cephalexin,...

Ứng dụng của enzyme trong kĩ thuật di truyền

Enzyme là công cụ đắc lực trong các bước thao tác của kĩ thuật di truyền như:

- Sử dụng các lysozyme, cellulase, protease nhằm phá vỡ thành, màng tế bào để thu vật liệu di truyền.
- Sử dụng các enzyme cắt giới hạn để cắt DNA.
- Sử dụng các DNA polymerase để nhân đoạn DNA trong PCR.
- Sử dụng ligase để nối các đoạn DNA.
- Sử dụng β -galactosidase trong sàng lọc các dòng tế bào mang vector tái tổ hợp.

Hầu hết các enzyme dùng trong kĩ thuật di truyền là các enzyme tái tổ hợp do các chế phẩm enzyme này đòi hỏi độ tinh sạch cao.

III. TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ ENZYME

Sự tăng trưởng mạnh mẽ của thị trường enzyme thế giới trong những năm gần đây cho thấy nhu cầu sử dụng enzyme sẽ tiếp tục tăng, đặc biệt là đối với các enzyme trong y dược học. Công nghệ enzyme trong tương lai sẽ tập trung vào các lĩnh vực sau:

- (1) Sử dụng công nghệ gene để cải biến các đặc tính của các enzyme cho phù hợp với các ứng dụng khác nhau, nâng cao hiệu quả xúc tác của enzyme.
- (2) Tìm kiếm các enzyme mới từ các vi sinh vật cực khắc nghiệt nhờ công nghệ phân tích hệ gene.
- (3) Phát triển kĩ thuật mới trong ứng dụng các loại chế phẩm enzyme nhằm loại bỏ các hạn chế của các loại chế phẩm enzyme hiện nay (enzyme tự do, enzyme cố định và enzyme trong tế bào).

Cơ hội nghề nghiệp trong ngành công nghệ enzyme được xác định theo ba hướng chính, bao gồm:

- Các nghề liên quan đến công nghệ sản xuất enzyme (kĩ sư, công nhân tham gia vào vận hành, giám sát và quản lí các thiết bị trong quy trình sản xuất enzyme...).

- Các nghề liên quan đến nghiên cứu phát triển enzyme (nghiên cứu viên trong các viện nghiên cứu, trường đại học và các cơ sở sản xuất enzyme).
- Các chuyên gia quản lí, tư vấn cho các dự án về công nghệ enzyme (chuyên viên, chuyên gia, nhà quản lí trong các công ty, sở, Bộ Khoa học và Công nghệ, Bộ Công Thương,...).

Em có biết

Abzyme là các kháng thể có hoạt tính enzyme. Công nghệ enzyme hiện nay có thể tạo ra các abzyme có tính đặc hiệu mô cao, có hoạt tính enzyme xác định. Do đó, các abzyme có thể tìm kiếm, gắn đặc hiệu với các kháng nguyên (ví dụ: các thụ thể trên tế bào ung thư, tế bào bệnh chuyển hoá,...) và thể hiện hoạt tính xúc tác tại vị trí có kháng nguyên. Một số abzyme được dùng làm thuốc đích trong điều trị bệnh nhằm loại bỏ các tế bào, mô bệnh mà không ảnh hưởng đến các tế bào, mô bình thường.

IV. THỰC HIỆN DỰ ÁN TÌM HIỂU VỀ ỨNG DỤNG ENZYME

1. Mục tiêu

- Thực hiện được bốn bước của quy trình tiến hành một dự án tìm hiểu về ứng dụng enzyme: (1) Xác định mục tiêu và nội dung nghiên cứu; (2) Lập kế hoạch thực hiện; (3) Thực hiện dự án; (4) Báo cáo kết quả.
- Tìm hiểu được thông tin về một số chế phẩm enzyme đang sử dụng ở địa phương và các lĩnh vực ứng dụng của chúng.

2. Nội dung

Tìm hiểu, thống kê và mô tả ứng dụng của một số chế phẩm enzyme hiện có trên thị trường tại địa phương em, ví dụ như:

- (1) Tìm hiểu về các enzyme được dùng trong thành phần của thuốc tại các hiệu thuốc ở địa phương.
- (2) Tìm hiểu về các enzyme được dùng trong thành phần của thức ăn chăn nuôi tại cơ sở sản xuất hoặc cửa hàng bán thức ăn chăn nuôi tại địa phương.
- (3) Tìm hiểu về các enzyme được dùng trong các sản phẩm (thực phẩm, mỹ phẩm, bột giặt,...) đang bán tại các chợ hoặc siêu thị tại địa phương.

3. Chuẩn bị

- Thiết bị chụp ảnh.
- Sổ tay ghi chép.
- Máy tính có kết nối mạng internet.

4. Cách tiến hành

- Chia và phân công nhóm học sinh (3 – 5 học sinh/nhóm), mỗi nhóm thực hiện một nội dung tìm hiểu.
- Thực hiện bốn bước của dự án tìm hiểu về ứng dụng enzyme:
 - Bước 1: Xác định mục tiêu và nội dung tìm hiểu (tìm hiểu cái gì? để làm gì? liệt kê các nội dung chi tiết cần tìm hiểu).
 - Bước 2: Lập kế hoạch thực hiện (xác định thời gian, địa điểm, phân công công việc cụ thể cho từng cá nhân) theo gợi ý trong bảng 10.2.

Bảng 10.2. Kế hoạch thực hiện dự án

STT	Nội dung thực hiện	Thời gian, địa điểm	Người thực hiện	Dự kiến kết quả
1	Tim hiểu một số chế phẩm enzyme trong hiệu thuốc ở địa phương	... giờ, ngày ... tháng ... năm ... Hiệu thuốc X, Y, Z	Nguyễn Văn A: chụp ảnh Phạm Thị B: ghi chép Trần Thị C: phỏng vấn	Tim hiểu được 5 loại thuốc có chứa chế phẩm enzyme trong thành phần
2	Thống kê và phân tích số liệu thu được	?	?	?
3	Viết báo cáo và báo cáo kết quả	?	?	?

– Bước 3: Thực hiện các nội dung của dự án theo bảng kế hoạch đã thống nhất.

– Bước 4: Báo cáo kết quả (dưới dạng bài viết hoặc trình bày trước lớp).

5. Nội dung báo cáo

- Giới thiệu mục tiêu, nội dung của dự án;
- Cách thức thực hiện dự án;
- Các kết quả đạt được (có thể trình bày theo gợi ý trong bảng 10.3);

Bảng 10.3. Kết quả tìm hiểu về một số chế phẩm enzyme

STT	Tên thuốc, mô tả chế phẩm enzyme trong thành phần của thuốc hoặc que thử, giấy thử	Ảnh chụp nhãn mác và thành phần của thuốc hoặc que thử, giấy thử	Mô tả công dụng của enzyme trong thuốc hoặc que thử, giấy thử
1	– Tên thuốc: ? – Thành phần của thuốc: ? – Chế phẩm enzyme trong thành phần của thuốc: ?	?	?
2	?	?	?

- Kết luận hoặc thảo luận về kết quả của dự án;
- Tài liệu hoặc tư liệu tham khảo (các bài báo nghiên cứu, các bài báo tổng quan, các website thống kê của các tổ chức có uy tín).



- Ứng dụng của các loại chế phẩm enzyme bao gồm: (1) chế phẩm enzyme tự do; (2) chế phẩm enzyme cố định; (3) chế phẩm enzyme trong tế bào.
- Enzyme được ứng dụng chủ yếu trong các lĩnh vực như công nghệ thực phẩm, y dược học và kĩ thuật di truyền.
- Triển vọng của công nghệ enzyme trong tương lai là: (1) Sử dụng công nghệ gene để cải biến các đặc tính của các enzyme; (2) Tìm kiếm các enzyme mới từ các vi sinh vật cực khắc nghiệt; và (3) Phát triển kĩ thuật mới trong ứng dụng các loại chế phẩm enzyme.
- Bốn bước của quy trình tiến hành một đề tài hoặc dự án về công nghệ enzyme gồm: (1) Xác định mục tiêu và nội dung nghiên cứu; (2) Lập kế hoạch thực hiện; (3) Thực hiện đề tài; (4) Báo cáo kết quả.

ÔN TẬP CHUYÊN ĐỀ 2

CÔNG NGHỆ ENZYME VÀ ỨNG DỤNG

I. TÓM TẮT NỘI DUNG

Cơ sở khoa học và một số thành tựu của công nghệ enzyme	– Cơ sở khoa học ứng dụng công nghệ enzyme. – Một số thành tựu của công nghệ enzyme.	
Công nghệ sản xuất enzyme	Công nghệ sản xuất enzyme tự nhiên	(1) Nuôi trồng và thu hoạch nguyên liệu sản xuất enzyme từ động vật, thực vật hoặc nuôi cấy vi sinh vật ↓ (2) Trích li enzyme từ nguyên liệu động vật, thực vật hoặc vi sinh vật ↓ (3) Tinh sạch enzyme ↓ (4) Phối chế, đóng gói và bảo quản chế phẩm enzyme
	Công nghệ sản xuất enzyme tái tổ hợp	(1) Tạo dòng DNA tái tổ hợp mang gene mã hoá enzyme ↓ (2) Chuyển DNA tái tổ hợp vào dòng tế bào chủ thích hợp cho biểu hiện gene ↓ (3) Biểu hiện gene và thu hồi enzyme tái tổ hợp ↓ (4) Tinh sạch enzyme tái tổ hợp ↓ (5) Phối chế, đóng gói và bảo quản chế phẩm enzyme tái tổ hợp
Ứng dụng và triển vọng của công nghệ enzyme	– Ứng dụng các chế phẩm enzyme: Enzyme tự do, enzyme cố định, enzyme trong tế bào. – Ứng dụng của enzyme trong công nghệ thực phẩm, y dược học và kĩ thuật di truyền. – Triển vọng và các cơ hội việc làm của ngành công nghệ enzyme trong tương lai.	

II. CÂU HỎI

1. Phân tích các cơ sở khoa học ứng dụng công nghệ enzyme. Các thành tựu nổi bật của công nghệ enzyme dựa trên kĩ thuật nào?
2. So sánh ưu và nhược điểm của chế phẩm enzyme tự nhiên và chế phẩm enzyme tái tổ hợp.
3. Đề xuất quy trình sản xuất hoặc ứng dụng một chế phẩm enzyme cho một lĩnh vực cụ thể ở địa phương em. Giải thích và nêu các bước cơ bản của quy trình đó.

Bài 11 KHÁI QUÁT VỀ VI SINH VẬT TRONG XỬ LÝ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG

Học xong bài học này, em có thể:

- Nêu được vai trò của vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm môi trường.
- Mô tả được quá trình phân giải các hợp chất trong xử lý môi trường bằng công nghệ vi sinh vật: phân giải hiếu khí, phân giải kỵ khí, lên men.



Vào ngày 20 tháng 4 năm 2010, một vụ nổ xảy ra trên giàn khoan dầu nước sâu Horizon ở vịnh Mexico (hình 11.1). Khoảng 5 triệu barrel (1 barrel = 158,97 lít) dầu tràn trên biển. Dầu thô phun từ giếng khoan bị vỡ phát tán vào nước, tạo thành dầu lơ lửng. Khoảng 22 % dầu thô bị tràn không thu hồi được. Cùng trong năm 2010, một nhóm các nhà khoa học nghiên cứu và cho biết có sự xuất hiện của một “tập đoàn” các vi sinh vật có khả năng sử dụng dầu thô (thành phần chính là hydrocarbon), cách nơi xảy ra sự cố 10 km. Mật độ các vi sinh vật này ở các khu vực nước bị nhiễm dầu cao gấp hai lần so với khu vực nước không bị ô nhiễm.



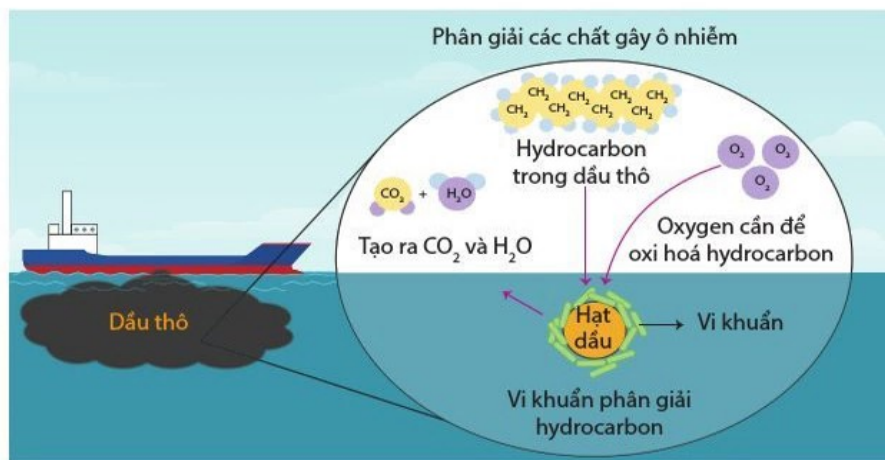
Hình 11.1. Giàn khoan nước sâu Horizon bị cháy trong vụ tràn dầu ở vịnh Mexico, sau đó đã bị chìm

Tại sao mật độ vi sinh vật lại tăng lên ở khu vực dầu bị tràn ở vịnh Mexico? Hiện tượng này gợi ý cho con người có thể sử dụng vi sinh vật vào mục đích gì?

I. VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT TRONG XỬ LÝ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG



1. Dựa vào hình 11.2, hãy cho biết vi sinh vật có vai trò gì trong xử lý ô nhiễm môi trường.
2. Nếu không có vi sinh vật thì điều gì sẽ xảy ra trên Trái Đất? Vì sao vi sinh vật thực hiện được vai trò đó?

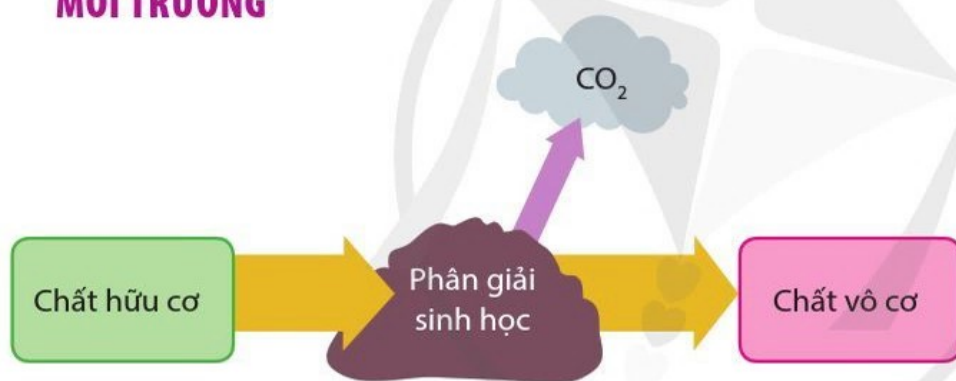


Hình 11.2. Vai trò của vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm môi trường

Vi sinh vật đóng vai trò là các sinh vật phân giải các hợp chất hữu cơ phức tạp tồn tại trong tự nhiên như xác của động vật, thực vật và các vi sinh vật thông qua các quá trình hô hấp hoặc lên men thành các phân tử đơn giản. Khi phân giải các hợp chất hữu cơ này, vi sinh vật thu nhận được nguồn carbon và năng lượng dùng cho sinh trưởng và sinh sản tạo sinh khối vi sinh vật. Sản phẩm cuối cùng của quá trình phân giải là CO_2 và nước được tuần hoàn trở lại sinh quyển.

Ở vi sinh vật, các quá trình phân giải diễn ra với tốc độ nhanh. Bên cạnh đó, nhiều loài vi sinh vật sống được ở những môi trường rất khắc nghiệt, vì vậy quá trình phân giải nhờ vi sinh vật có thể diễn ra khắp mọi nơi trên Trái Đất. Khi nồng độ các chất hữu cơ trong tự nhiên vượt quá ngưỡng sẽ gây ô nhiễm môi trường, với những khả năng ưu việt trên vi sinh vật tham gia thực hiện quá trình phân giải các chất đó thành những chất đơn giản, ít hoặc không gây ô nhiễm.

II. QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI CÁC HỢP CHẤT TRONG XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG



Hình 11.3. Phân giải sinh học nhờ vi sinh vật

Phân giải sinh học nhờ vi sinh vật là quá trình vi sinh vật bẻ gãy các liên kết hoá học trong các chất hữu cơ phức tạp thành các chất đơn giản hơn và xảy ra trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí. Quá trình phân giải sinh học cung cấp nguồn carbon và năng lượng cho quá trình sinh trưởng, sinh sản tạo sinh khối vi sinh vật. Quá trình đó được diễn ra theo một chuỗi liên tục với sự tham gia của nhiều loài vi sinh vật, nhờ đó tạo ra chu trình tuần hoàn vật chất trong tự nhiên và làm sạch môi trường.

Kết quả của quá trình phân giải sinh học gồm: sinh khối tế bào vi sinh vật, các hợp chất hữu cơ đơn giản hơn hoặc các chất vô cơ (khoáng, CO_2 và H_2O).

Em có biết

Các nhà khoa học dự đoán rằng nếu toàn bộ vi sinh vật trên Trái Đất biến mất thì xác động vật, thực vật sẽ chất đống trên bề mặt Trái Đất; thực vật sẽ chết do không thể thu nhận được muối khoáng, các chu trình tuần hoàn vật chất trong tự nhiên bị ngừng lại, kéo theo sự sống của tất cả sinh vật dị dưỡng bị ngừng trệ.



Quan sát hình 11.3 và cho biết phân giải sinh học là gì.



Vi sao quá trình phân giải các chất khác nhau trong tự nhiên là cơ sở của công nghệ vi sinh vật xử lý ô nhiễm môi trường?



1. Hãy kể tên một số loại chất thải (có nguồn gốc từ nông nghiệp hoặc từ công nghiệp) ở địa phương em đang sinh sống.
2. Công nghệ vi sinh vật xử lý ô nhiễm môi trường dựa trên cơ sở khoa học nào?

Quá trình phân giải là một chuỗi các phản ứng; mỗi phản ứng được xúc tác bởi một loại enzyme đặc hiệu sinh ra bởi tế bào vi sinh vật thực hiện quá trình phân giải. Quá trình phân giải đó cho phép nhiều vi sinh vật cùng tham gia chuỗi chuyển hoá các chất trong môi trường nên tốc độ phân giải nhanh. Đó là một đặc điểm ưu việt của vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm môi trường.

Trong tự nhiên, khi nồng độ của các hợp chất chứa carbon (rơm rạ), nitrogen (xác động vật), lưu huỳnh, phosphorus,... vượt quá ngưỡng thường gây nên ô nhiễm môi trường. Vi sinh vật đóng vai trò chuyển hoá các hợp chất gây ô nhiễm đó thành các chất ít hoặc không ô nhiễm.

Hợp chất hữu cơ chứa carbon có trong môi trường gồm các polymer trong xác động vật, thực vật và vi sinh vật. Các hợp chất này được vi sinh vật phân giải thành CO_2 trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí. Ví dụ: nguồn carbon thường tìm thấy trong xác thực vật được ủ thành phân bón giúp tăng độ phì nhiêu cho đất. Các vi sinh vật tham gia phân giải xác thực vật khá đa dạng, gồm có vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm.



1. Trong các hộ gia đình, rác hữu cơ từ nhà bếp được thu gom và ủ thành phân trong thùng chứa rác thải dùng để chăm sóc cho cây trồng (hình 11.4). Em hãy cho biết quá trình sinh học nào diễn ra trong thùng chứa rác thải đó.
2. Hiện nay, ở ngoại ô các thành phố lớn và các vùng nông thôn, rơm rạ là nguồn phế phẩm nông nghiệp chủ yếu, thường được đốt bỏ, do đó gây ô nhiễm không khí. Bằng những hiểu biết của mình, em hãy đưa ra biện pháp xử lý rơm rạ nhờ vi sinh vật, vừa giảm thiểu ô nhiễm môi trường, vừa thu được những sản phẩm có ích cho con người.



Hình 11.4. Ủ phân hữu cơ tại hộ gia đình



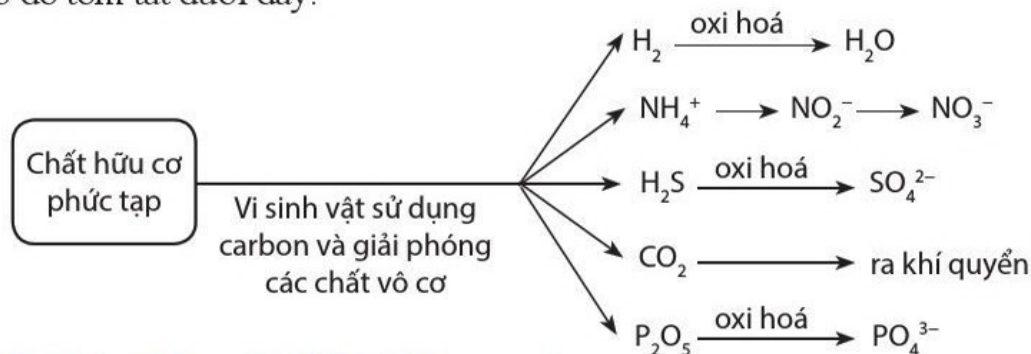
Cho biết ý nghĩa của quá trình phân giải rác hữu cơ đối với đất. Nêu ứng dụng của quá trình này.

Hợp chất hữu cơ chứa nitrogen có nguồn gốc từ thực vật và động vật phổ biến nhất trong tự nhiên là protein. Trong tự nhiên, lưu huỳnh tồn tại trong hợp chất hữu cơ (amino acid, enzyme, coenzyme) và hợp chất vô cơ phổ biến là các muối sulfate.

Phosphorus tồn tại trong tự nhiên gồm hai dạng phosphorus hữu cơ như nucleic acid, ATP, ADP, AMP, phospholipid,... và phosphorus vô cơ trong các chất khoáng. Những dạng phosphorus này cây không sử dụng trực tiếp mà phải được chuyển sang dạng muối của H_3PO_4 nhờ vai trò của các vi sinh vật.

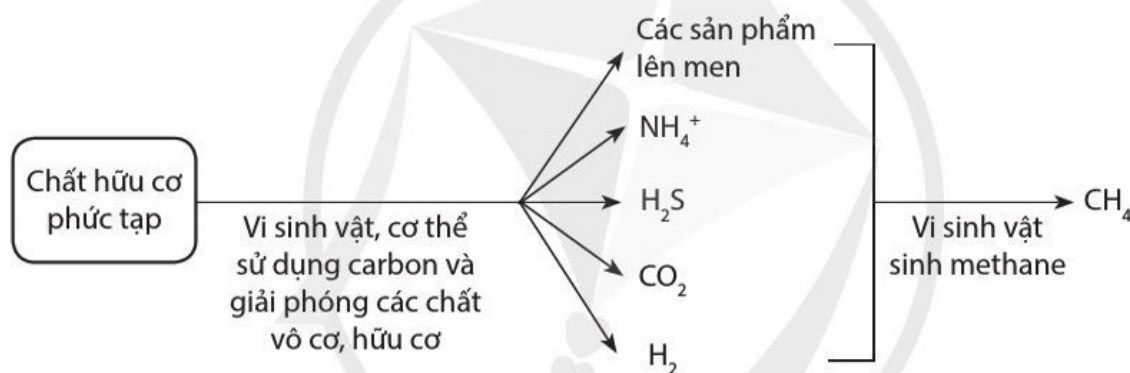
1. Quá trình phân giải hiếu khí

Trong điều kiện môi trường hiếu khí, các hợp chất hữu cơ phức tạp như hợp chất hữu cơ chứa carbon, nitrogen, lưu huỳnh, phosphorus rất dễ bị phân giải thông qua một loạt các phản ứng với sự tham gia của nhiều nhóm vi sinh vật và giải phóng ra các chất vô cơ khác nhau như sơ đồ tóm tắt dưới đây.



2. Quá trình phân giải kỵ khí (lên men)

Trong điều kiện môi trường kỵ khí nhờ các nhóm vi sinh vật khác nhau, các hợp chất hữu cơ bị phân giải thành các chất vô cơ hoặc lên men thành các chất hữu cơ khác. Sản phẩm cuối của quá trình phân giải này là khí methane nhờ vi sinh vật sinh methane.



Bên cạnh các chất hữu cơ tự nhiên, trong môi trường tồn tại rất nhiều hợp chất hoá học tổng hợp (vô cơ hoặc hữu cơ) từ các ngành công nghiệp và nông nghiệp hoặc hoạt động hằng ngày của con người. Các vi sinh vật cũng có khả năng phân giải các hợp chất hoá học tổng hợp bằng cách biến đổi cấu trúc hoá học của các hợp chất đó khiến chúng trở nên vô hại đối với một hoặc nhiều loài sinh vật nhạy cảm với các hợp chất đó. Trong quá trình phân giải, có thể chỉ một loài vi sinh vật tham gia nhưng hầu hết là một “tập đoàn” gồm nhiều loài vi sinh vật thực hiện.



- Nhờ khả năng phân giải sinh học, vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong quá trình xử lý các chất gây ô nhiễm môi trường.
- Phân giải sinh học nhờ vi sinh vật là quá trình vi sinh vật bẻ gãy các liên kết hoá học trong các chất hữu cơ phức tạp thành các chất đơn giản hơn hoặc thành CO_2 và H_2O . Quá trình phân giải sinh học cung cấp nguồn carbon và năng lượng cho sinh trưởng và sinh sản tạo ra sinh khối vi sinh vật. Quá trình phân giải sinh học của vi sinh vật có thể xảy ra trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí.

Bài 12 CÔNG NGHỆ ỨNG DỤNG VI SINH VẬT TRONG XỬ LÝ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG ĐẤT, NƯỚC

Học xong bài học này, em có thể:

Trình bày và giải thích được một số công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong:

- Xử lý ô nhiễm môi trường đất;
- Xử lý nước thải và làm sạch nước.



Hiện nay, ô nhiễm môi trường đất và nước đang là vấn đề nhận được nhiều sự quan tâm. Việc tìm ra và ứng dụng những công nghệ xanh trong xử lý chất thải, vừa hiệu quả vừa thân thiện với môi trường luôn là ưu tiên của các nhà khoa học cũng như các nhà quản lý. Công nghệ vi sinh vật là một giải pháp như thế. Vậy xử lý ô nhiễm môi trường đất và nước bằng công nghệ vi sinh vật được thực hiện như thế nào?

I. CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT TRONG XỬ LÝ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG

Công nghệ vi sinh vật là ngành khoa học công nghệ nghiên cứu sử dụng vi sinh vật trong các quy trình kỹ thuật để sản xuất ra các sản phẩm phục vụ nhu cầu của con người. Sản phẩm của công nghệ vi sinh vật là sinh khối vi sinh vật hoặc các sản phẩm trao đổi của vi sinh vật. Công nghệ vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm môi trường là một bộ phận của công nghệ vi sinh vật, trong đó quy trình kỹ thuật sử dụng tế bào vi sinh vật hoặc sản phẩm trao đổi từ vi sinh vật để phân giải, biến đổi các chất gây ô nhiễm môi trường. Dựa vào đặc điểm trao đổi chất của vi sinh vật, các quá trình xử lý ô nhiễm môi trường có thể tiến hành trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí.

Để xử lý ô nhiễm môi trường bằng công nghệ vi sinh vật, cần thực hiện theo các bước:



Hình 12.1. Sơ đồ các bước xử lý ô nhiễm môi trường bằng công nghệ vi sinh vật

Dựa trên các kết quả quan trắc thường xuyên các chỉ tiêu môi trường, đánh giá hiện trạng môi trường cần được tiến hành định kỳ. Kết quả đánh giá cho phép xác định nguồn chất gây ô nhiễm môi trường. Để xử lý chất gây ô nhiễm, đối tượng vi sinh vật hoặc sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật cần được lựa chọn dựa trên khả năng phân giải các chất của vi sinh vật. Quy trình kỹ thuật được thiết kế nhằm tạo các điều kiện thuận lợi nhất cho quá trình xử lý chất gây ô nhiễm nhờ vi sinh vật. Đánh giá lại hiện trạng môi trường sau xử lý cho biết hiệu quả xử lý ô nhiễm môi trường của vi sinh vật hay sản phẩm trao đổi của vi sinh vật cũng như sự phù hợp của quy trình kỹ thuật.

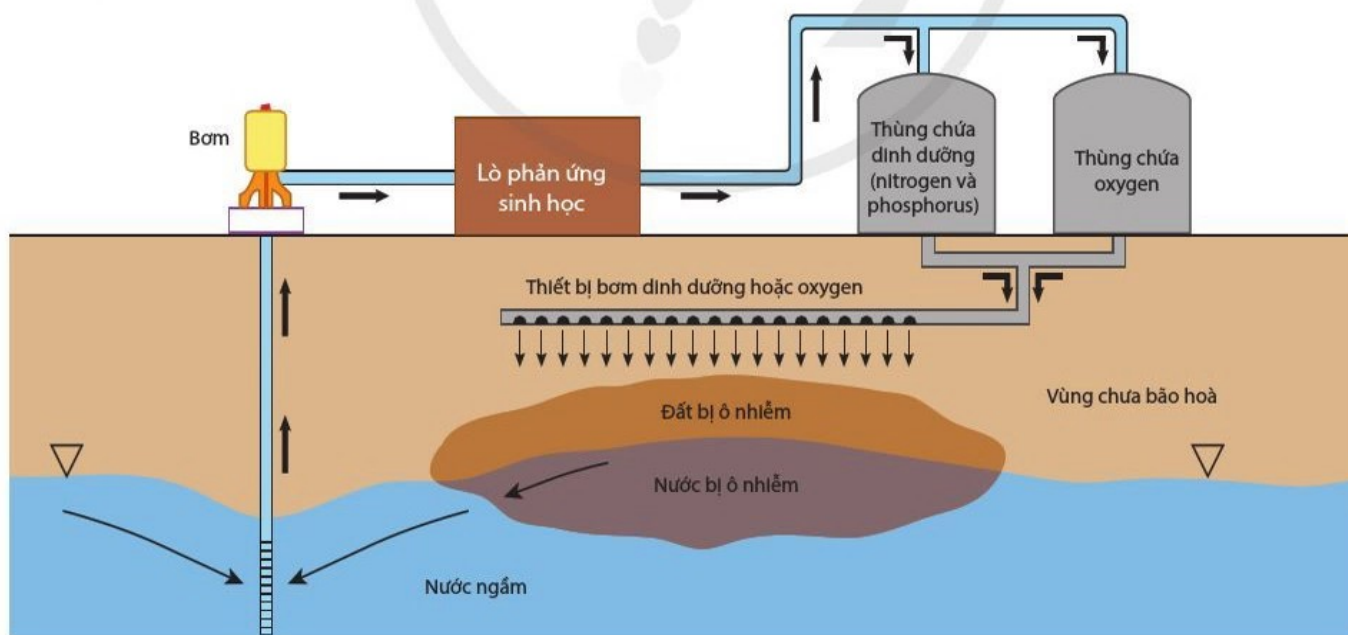


Nêu những loại sản phẩm của công nghệ vi sinh vật dùng trong xử lý ô nhiễm môi trường mà em biết.

II. XỬ LÝ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG BẰNG PHỤC HỒI SINH HỌC

Phục hồi sinh học (bioremediation) là quá trình sử dụng các sinh vật, đặc biệt là các vi sinh vật trong tự nhiên để phân giải các chất gây ô nhiễm môi trường đất, nước ngầm và không khí thành những chất ít độc hoặc không độc. Trong quá trình phục hồi sinh học, tốc độ phân giải các chất gây ô nhiễm của các vi sinh vật có thể được tăng cường bằng việc bổ sung các chất dinh dưỡng cần thiết (nguồn nitrogen, phosphorus) và các yếu tố tác động đến sinh trưởng của vi sinh vật (pH, độ thoáng khí, độ ẩm,...). Quá trình này được gọi là kích thích sinh học.

Vi sinh vật có khả năng phân giải chất gây ô nhiễm có thể là vi sinh vật bản địa, có nguồn gốc tại nơi xảy ra ô nhiễm hoặc là vi sinh vật ngoại lai, có nguồn gốc từ nơi khác, được tuyển chọn tại các phòng thí nghiệm hoặc là các vi sinh vật đã được chuyển gene, có khả năng phân giải chất gây ô nhiễm.



Hình 12.2. Sơ đồ các bước phục hồi sinh học *in situ* đối với đất ô nhiễm và phục hồi sinh học *ex situ* đối với nước ngầm ô nhiễm

Khi quần thể vi sinh bản địa không có khả năng phân giải các chất gây ô nhiễm, hoặc số lượng quá ít do độc tính của chất gây ô nhiễm, các vi sinh vật ngoại lai có khả năng phân giải sẽ được chọn lọc, bổ sung một cách thận trọng vào khu vực bị ô nhiễm. Quá trình này được gọi là tăng cường sinh học.

Phục hồi sinh học có thể tiến hành ngay tại vị trí xảy ra ô nhiễm đất hoặc nước và được gọi là phục hồi sinh học nguyên vị (*in situ*); khi đất hoặc nước bị ô nhiễm được mang đi nơi khác để xử lý thì gọi là phục hồi sinh học chuyển vị (*ex situ*) (hình 12.2). Phục hồi sinh học đã được áp dụng khá rộng rãi trong xử lý ô nhiễm môi trường đất, nước và không khí. Tuy nhiên, cho đến nay không có một công thức chung nào cho tất cả các trường hợp cần xử lý.

III. XỬ LÝ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG ĐẤT

Đất là môi trường sống tự nhiên của rất nhiều loài sinh vật. Nếu 200 năm trước vấn đề ô nhiễm chỉ có tính địa phương thì ngày nay ô nhiễm đất là vấn đề toàn cầu do quá trình công nghiệp hoá, đô thị hoá và phát triển ngày càng đa dạng các hoạt động của loài người. Đất ô nhiễm do bị khai thác quá mức, chế độ canh tác không hợp lý khiến chất dinh dưỡng bị cạn kiệt, mất thảm thực vật che phủ. Các hoạt động sinh sống và sản xuất của con người đã tạo ra lượng chất thải khổng lồ gây ô nhiễm môi trường đất, nước và không khí. Môi trường đất cũng bị ô nhiễm do các chất hoá học như các kim loại, dầu mỡ, chất độc hoá học, thuốc bảo vệ thực vật, các loại phân bón và do các vi sinh vật gây bệnh.

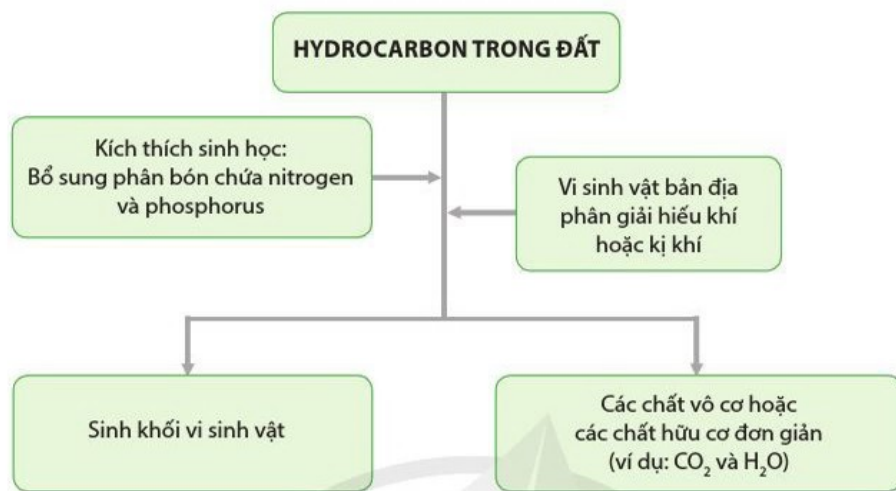
Xử lý đất ô nhiễm hydrocarbon dầu mỡ

Các hợp chất hydrocarbon là thành phần chủ yếu của dầu mỡ và còn được tìm thấy trong chất tẩy rửa, dung môi công nghiệp. Hydrocarbon xâm nhập vào đất hoặc nước do sự cố tràn dầu từ đường ống dẫn dầu, các bể chứa dầu, các vụ chìm tàu chở dầu, hay do xả thải nước nhiễm hydrocarbon,... Các hydrocarbon dễ dàng ngấm vào đất ảnh hưởng đến khả năng thấm, độ xốp, pH, độ dẫn điện, độ mặn, thành phần và cấu trúc hợp chất hữu cơ trong đất do thừa nguồn carbon, ít nitrogen cũng như ảnh hưởng đến thành phần quần xã vi sinh vật trong đất và thực vật trên đất. Bên cạnh đó, một số hydrocarbon là mối đe dọa lớn đối với sức khỏe con người khi xâm nhập vào cơ thể người và động vật qua đường hô hấp, tiếp xúc với da và chế độ ăn uống; gây suy giảm chức năng của gan và thận; là tác nhân gây ung thư, đột biến,...

Năm 1989, khi sự cố tràn dầu xảy ra do tàu chở dầu Exxon Valdez đâm phải rạn san hô, nhiều loài vi sinh vật như vi khuẩn, vi nấm và một số vi tảo có thể phân giải nguồn hydrocarbon khổng lồ từ dầu mỡ trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí. Tuy nhiên, thành phần của dầu mỡ lại thiếu các nguồn dinh dưỡng nitrogen và phosphorus nên quá trình phân giải các hợp chất hydrocarbon nhờ vi sinh vật bị hạn chế. Nhằm thúc đẩy quá trình phục hồi sinh học tại các khu vực đất bị ô nhiễm bởi hydrocarbon dầu mỡ, người ta đã bổ sung các chất vô cơ để kích thích sinh học các vi sinh vật bản địa như *Achromobacter*, *Alkanindiges*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptobacillus*,... trong đất. Hiệu quả phân giải hydrocarbon sau khi bổ sung các chất vô cơ tăng gấp 3 – 4 lần so với trước khi bổ sung.

Quá trình oxi hoá các sản phẩm dầu mỡ trong đất bị ô nhiễm nhờ các vi sinh vật trong tự nhiên diễn ra mạnh mẽ nếu nhiệt độ đủ ấm và nguồn dinh dưỡng vô cơ được cung cấp đủ thông qua việc bón phân có chứa nitrogen và phosphorus.

Quy trình xử lý đất ô nhiễm hydrocarbon được tóm tắt trong hình 12.3.



Hình 12.3. Sơ đồ xử lý đất ô nhiễm hydrocarbon bằng phục hồi sinh học

Xử lý đất ô nhiễm thuốc bảo vệ thực vật

Có rất nhiều loại thuốc bảo vệ thực vật gồm thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, thuốc trừ nấm bệnh được phép lưu hành trên thị trường. Các thuốc bảo vệ thực vật có thể là các hợp chất chứa chlorine, nitrogen, phosphorus, vòng thơm. Một số thuốc bảo vệ thực vật được vi sinh vật sử dụng làm nguồn cung cấp carbon và năng lượng trong quá trình phân giải, nhưng một số khác hầu như rất khó bị phân giải hoặc không bị phân giải bởi vi sinh vật, thậm chí còn tiêu diệt hệ sinh vật trong đất. Ví dụ: thuốc diệt cỏ atrazine và các dẫn xuất chlorine độc hại của nó thường xâm nhập vào môi trường thông qua quá trình kết tủa, rửa trôi và được phát hiện tồn tại bền vững không chỉ trong đất mà còn trong nước mặt và nước ngầm. Các nghiên cứu cho thấy atrazine gây rối loạn nội tiết ở người, có thể khiến ếch đực trở thành ếch cái hoặc lưỡng tính và là yếu tố tiềm ẩn gây ung thư.

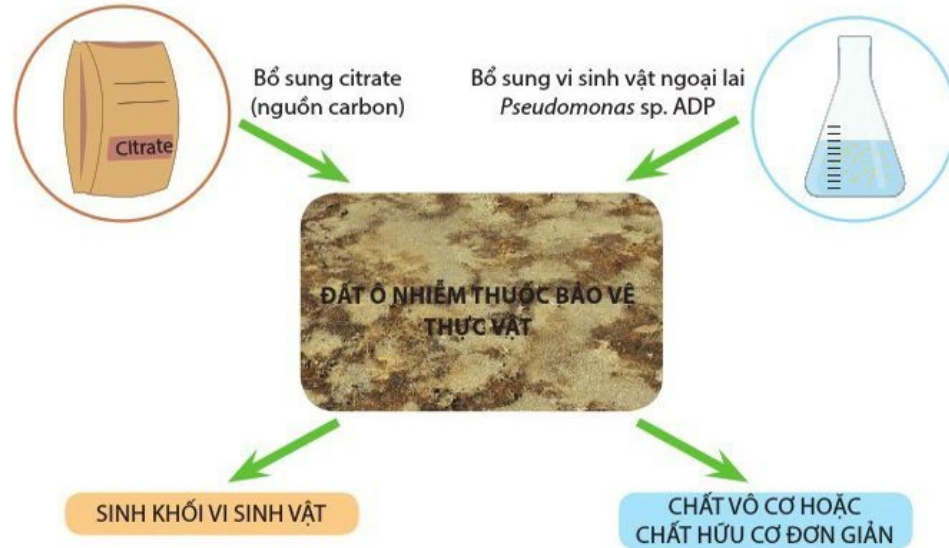
Ví dụ: Trên thực tế, khi tiến hành làm sạch đất ô nhiễm atrazine bằng biện pháp phục hồi sinh học, vi khuẩn *Pseudomonas* sp. ADP, có khả năng sử dụng atrazine như nguồn nitrogen duy nhất, được lựa chọn bổ sung vào khu vực đất bị ô nhiễm (tăng cường sinh học). Bên cạnh đó, việc kích thích sinh học bằng bổ sung citrate vào đất cung cấp nguồn carbon cho vi khuẩn cũng được thực hiện (hình 12.4). Hiệu quả phân giải atrazine nhờ vi khuẩn *Pseudomonas* sp. ADP đạt 79 – 87 %.



1. Dựa vào hình 12.3 và 12.4 mô tả các bước xử lý ô nhiễm đất bằng phục hồi sinh học.
2. Tại sao cần bổ sung các chất vô cơ như nitrogen và phosphorus vào môi trường đất bị ô nhiễm hydrocarbon mà không cần bổ sung glucose?

KÍCH THÍCH SINH HỌC

TĂNG CƯỜNG SINH HỌC



Hình 12.4. Sơ đồ xử lý đất ô nhiễm thuốc bảo vệ thực vật bằng phục hồi sinh học

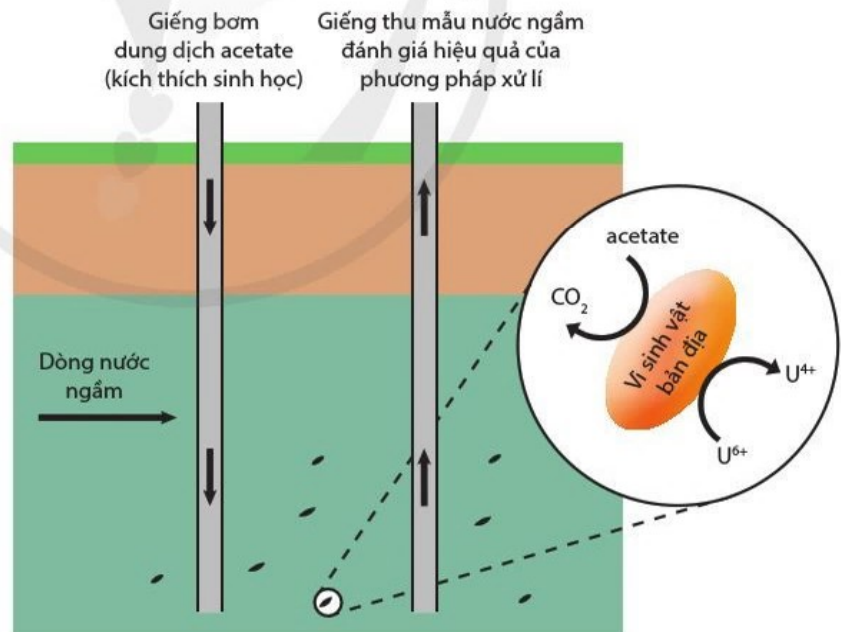
IV. XỬ LÝ NƯỚC THẢI VÀ LÀM SẠCH NƯỚC

1. Xử lý nước ngầm ô nhiễm kim loại nặng

Kim loại nặng có tính chất phóng xạ là các chất độc; gây ô nhiễm môi trường đất, nước; không thể bị phân giải mà chỉ có thể chuyển hoá hoá học nhờ vi sinh vật. Uranium (U) là kim loại nặng có tính chất phóng xạ và là vật liệu quan trọng trong công nghệ hạt nhân. Uranium thường được thải ra môi trường thông qua nước thải từ các lò phản ứng hạt nhân trong nhà máy điện hạt nhân và các mỏ khai thác khoáng sản.



1. Dựa vào hình 12.5 mô tả các bước xử lý ô nhiễm nước bằng phục hồi sinh học.
2. Hãy giải thích vai trò của acetate trong quá trình phục hồi nước ô nhiễm uranium.



Hình 12.5. Sơ đồ xử lý nước ngầm ô nhiễm kim loại nặng bằng phục hồi sinh học

Quặng uranium trong các khu vực chứa là nguy cơ gây ô nhiễm môi trường khi chất phóng xạ di chuyển qua nước ngầm ra ngoài gây nguy hiểm đến môi trường và sức khỏe con người. Các phương pháp phục hồi hoá lý (như kết tủa, lọc, ...) rất tốn kém do ô nhiễm thường lan rộng.

Trong thực tế, tại các khu vực đất bị ô nhiễm uranium, để khử U^{6+} (dạng hoà tan) thành U^{4+} (dạng UO_2), có tính bất động nên hạn chế sự di chuyển của uranium vào trong nước ngầm, người ta sử dụng các vi khuẩn bản địa có khả năng khử kim loại (Fe^{3+} hoặc Mn^{6+}) *Shewanella putrefaciens*, *Geobacter sulfurreducens* và vi khuẩn khử sulphate *Desulfovibrio desulfuricans* có trong trầm tích. Quá trình khử uranium của các vi sinh vật này được kích thích sinh học bằng việc bơm chất hữu cơ acetate, đóng vai trò là chất cho điện tử, vào khu vực bị ô nhiễm uranium. Quá trình xử lý này đã làm giảm hàm lượng uranium trong nước ngầm bị ô nhiễm xuống dưới ngưỡng giới hạn cho phép của tiêu chuẩn nước ăn uống (hình 12.5).

2. Xử lý nước thải

Đặc điểm của nước thải

Nước thải là nước đã qua sử dụng, bị biến đổi tính chất vật lý, hoá học và sinh học. Nước thải có nguồn gốc từ sinh hoạt hoặc từ công nghiệp, nông nghiệp và cần được xử lý trước khi thải ra môi trường. Tùy thuộc vào nguồn phát sinh, nước thải có thể chứa các hợp chất hữu cơ, vô cơ và các vi sinh vật gây bệnh có nguy cơ gây ô nhiễm môi trường.

Các chất hữu cơ có trong nước thải có thể được chia thành ba nhóm: các hợp chất hữu cơ dễ bị phân giải (ví dụ: protein, carbohydrate, các chất béo từ động vật và thực vật) có nhiều trong nước thải sinh hoạt hoặc nước thải từ các nhà máy chế biến thực phẩm; các chất hữu cơ khó bị phân giải (như các hợp chất hữu cơ có vòng thơm bay hơi, có chlorine, phosphorus,...); một số hợp chất hữu cơ khó phân giải, có độc tính cao, có khả năng tích lũy và tồn tại lâu dài trong môi trường (như các hợp chất phenol, hoá chất bảo vệ thực vật, xà phòng và chất tẩy rửa, tannin và lignin). Hai nhóm hợp chất hữu cơ sau thường chứa nhiều trong nước thải công nghiệp, các vùng nông nghiệp, lâm nghiệp sử dụng nhiều thuốc trừ sâu, thuốc kích thích sinh trưởng,... Các chất vô cơ cũng có hàm lượng khá cao trong các loại nước thải. Những chất vô cơ này gồm các hợp chất chứa nitrogen (tồn tại dưới dạng các muối nitrate, NH_3 hoặc các muối ammonium); các hợp chất chứa phosphorus (như các muối phosphate từ phân bón hoặc từ động vật, polyphosphate từ chất tẩy rửa,...); các kim loại nặng thường có độc tính cao đối với người và động vật và tồn tại nhiều trong nước thải công nghiệp (ví dụ: chì, thủy ngân, arsenic, chromium, cadmium, đồng, kẽm,...) và một số chất vô cơ khác như SO_4^{2-} , Cl^- , CN^- , H_2S , Mn, Al,...

Quy trình xử lý nước thải: Các nhà máy xử lý nước thải đã áp dụng công nghệ phối hợp các quá trình vật lý, hoá học và sinh học để loại bỏ hoặc trung hoà các chất gây ô nhiễm.

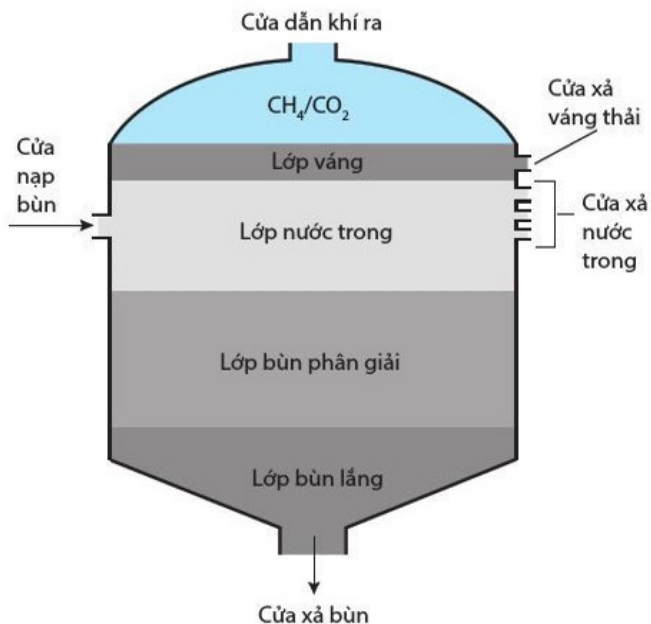
Xử lý nước thải gồm ba giai đoạn chính: xử lý nước thải bậc một; xử lý nước thải bậc hai và xử lý nước thải bậc ba.

Xử lý nước thải bậc một: Đây là quá trình chuẩn bị cho các bước xử lý tiếp theo. Rác thải rắn hữu cơ hay vô cơ được tách riêng bằng phương pháp sàng lọc, kết tủa các hạt có kích thước nhỏ và làm lắng trong bể chứa thành bùn. Bùn sẽ được giữ trong các bể lắng, phần nước thải theo đường ống và được tiếp tục xử lý ở các bước tiếp theo.

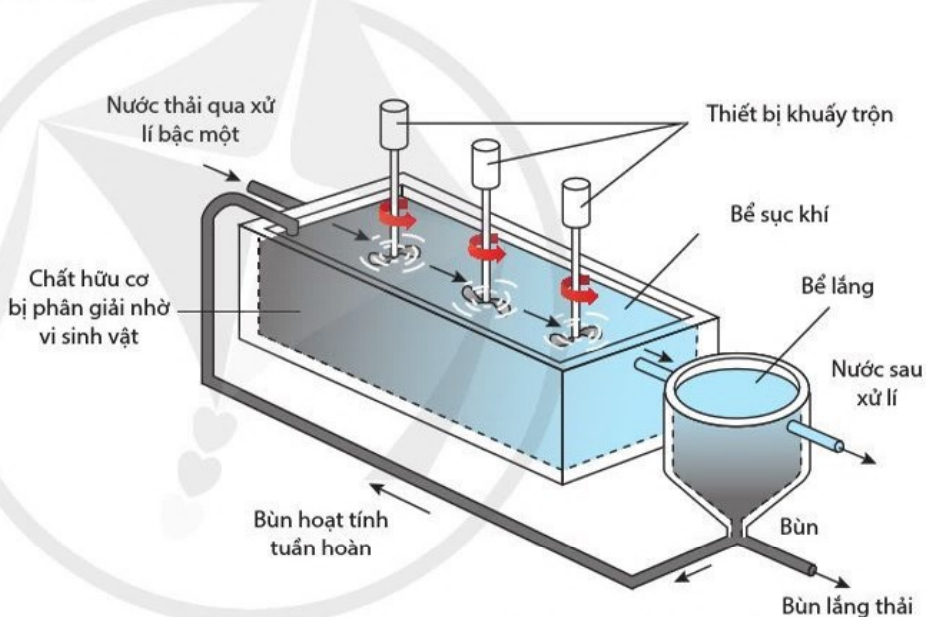
Xử lý nước thải bậc hai: Đây là giai đoạn xử lý sinh học làm giảm hàm lượng thành phần các chất hữu cơ hoà tan trong nước thải. Nhờ quá trình phân giải hiếu khí và phân giải kỵ khí, các hợp chất hữu cơ được chuyển hoá thành sinh khối vi sinh vật và khí CO_2 . Tùy thuộc vào loại nước thải, nước thải sẽ được xử lý hiếu khí hay kỵ khí hoặc phối hợp cả hai.

Xử lý nước thải kỵ khí: Quá trình xử lý nước thải bao gồm một loạt các bước phân giải nhờ vi sinh vật như *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Methanobacterium*, *Methanococcus*,... trong điều kiện không có oxygen phân tử.

Quá trình xử lý được tiến hành trong các bồn chứa lớn, kín và được sử dụng để xử lý nước thải chứa nhiều hợp chất hữu cơ không tan như chất xơ, cellulose, protein với chỉ số BOD cao (hình 12.6). Các chất rắn lơ lửng và các đại phân tử này được cắt thành các hợp chất hoà tan, phân giải qua nhiều bước thành sản phẩm cuối cùng là CH_4 , CO_2 , H_2 , NH_3 và H_2S .



Hình 12.6. Xử lý nước thải kỵ khí



Hình 12.7. Hệ thống bùn hoạt tính hiếu khí

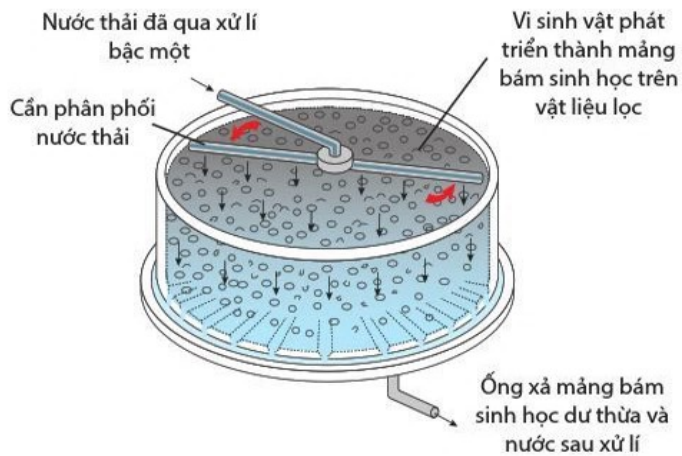
Xử lý nước thải hiếu khí: Nước thải có hàm lượng chất hữu cơ thấp được xử lý nhờ các vi sinh vật phân giải hiếu khí như *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Zooglea*,...

Công nghệ xử lý nước thải bằng bùn hoạt tính (activated sludge) xuất hiện từ sớm, nhưng hiện nay vẫn được nghiên cứu cải tiến để áp dụng. Trong bồn chứa, nước thải được khuấy đảo để khuếch tán oxygen không khí vào nước hoặc bổ sung oxygen trực tiếp bằng sục khí (hình 12.7). Các vi sinh vật sinh trưởng nhờ các chất hữu cơ trong nước, tạo sinh khối và kết bông (khối bùn có độ xốp) để dễ dàng tách ra khỏi nước thải. Thời gian xử lý nước thải bằng bùn hoạt tính kéo dài khoảng 5 – 10 giờ, sau đó nước được bơm sang bể lắng. Một phần bùn hoạt tính được tuần hoàn trở lại bể hiếu khí để tiếp tục tham gia xử lý nước thải mới.

Một công nghệ khác được sử dụng để xử lý nước thải là lọc nhỏ giọt (trickling filter) (hình 12.8). Trong bồn chứa, nước thải được chảy qua lớp vật liệu lọc bằng đá (như đá cuội, đá dăm, đá ong) hoặc các vật liệu rắn khác (như vòng gốm, than đá, than cốc, gỗ mảnh, chất dẻo) dày khoảng 2 m, trên đó các vi sinh vật như vi khuẩn *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Bacillus*,... đã phát triển thành các màng bám sinh học hay màng sinh học (biofilm). Các chất hữu cơ hoà tan trong nước thải được phân giải bởi quần xã các vi sinh vật đó và chuyển hoá thành CO_2 , NH_3 , NO_3^- , SO_4^{2-} .

Hệ thống hiếu khí mở rộng cũng được sử dụng để xử lý nước thải. Sau giai đoạn xử lý bậc hai, chlorine hoặc ozone hoặc tia UV được sử dụng để tiêu diệt các vi sinh vật trong nước thải trước khi xả ra các thủy vực.

Xử lý nước thải bậc ba: Đây là giai đoạn làm sạch nước thải hơn như giảm chỉ số BOD, loại bỏ hàm lượng nitrogen, phosphorus tồn tại ở dạng hợp chất vô cơ, những chất có thể gây nên hiện tượng phú dưỡng trong các thủy vực, cũng như loại bỏ kim loại nặng, các chất hữu cơ và các vi sinh vật trong nước thải. Việc áp dụng xử lý nước thải bậc một, bậc hai hay bậc ba phụ thuộc vào chất lượng nước thải đầu vào và quy chuẩn nước thải đầu ra. Hiện nay, công nghệ xử lý nước thải có nhiều cải tiến và được áp dụng ở nhiều quốc gia khác nhau. Ví dụ: như hệ thống AAO (còn gọi là ANANOX: Anaerobic – kỵ khí; Anoxic – thiếu khí; Oxidic – hiếu khí),...



Hình 12.8. Hệ thống lọc nhỏ giọt



1. Sự khác nhau giữa xử lý nước thải hiếu khí và kỵ khí bậc hai là gì? Kết quả của quá trình xử lý kỵ khí nước thải là gì?
2. Quá trình xử lý nước thải bậc một và bậc hai khác nhau như thế nào?



Hãy sắp xếp lại mục tiêu chính tương ứng với mỗi giai đoạn xử lý nước thải trong bảng dưới đây. Hãy cho biết vai trò của vi sinh vật trong các giai đoạn xử lý nước thải có liên quan.

Các giai đoạn xử lý nước thải	Mục tiêu chính
Xử lý nước thải bậc một	Loại bỏ các chất hữu cơ hoà tan bằng biện pháp sinh học
Xử lý nước thải bậc hai	Loại bỏ nguồn dinh dưỡng vô cơ bằng các biện pháp sinh học, hoá học
Xử lý nước thải bậc ba	Loại bỏ rác thải rắn không hoà tan bằng cách lắng, sàng lọc, bổ sung phèn và các chất đông tụ khác cùng các quy trình vật lý khác.

Em có biết

Hiện nay, các chất ô nhiễm có hoạt tính sinh học mới đang xâm nhập vào môi trường và có thể đặt ra những thách thức đối với việc xử lý sinh học bằng vi sinh vật. Các chất ô nhiễm mới này bao gồm thành phần hoạt tính trong dược phẩm, sản phẩm chăm sóc cá nhân, nước hoa, sản phẩm gia dụng, kem chống nắng,... Các chất ô nhiễm "mới" này liên tục được thải vào môi trường, chủ yếu thông qua nước thải. Các hợp chất estrogen tổng hợp được bài tiết qua nước tiểu của phụ nữ đang sử dụng thuốc tránh thai và cuối cùng được thải ra môi trường, có thể kích hoạt các gene đáp ứng estrogen ở động vật thủy sinh như cá và góp phần vào quá trình "cái hoá" các con đực.



Vấn đề đất ô nhiễm dioxin ở nhiều địa phương của Việt Nam đã được nghiên cứu xử lý bằng nhiều công nghệ khác nhau. Hãy tìm hiểu và tóm tắt lại công nghệ sử dụng vi sinh vật để xử lý đất nhiễm dioxin ở Việt Nam.

Tim hiểu thêm

Để đánh giá mức độ ô nhiễm nước, một số chỉ tiêu của nước thải cần được quan trắc và so sánh với quy chuẩn (ví dụ: QCVN 40:2011/BTNMT đối với nước thải công nghiệp; QCVN14 2008/BTNMT đối với nước thải sinh hoạt).

Chỉ số BOD (Biological Oxygen Demand – nhu cầu oxygen sinh học) là lượng oxygen hoà tan mà vi sinh vật sử dụng để phân giải hiếu khí hoàn toàn các chất hữu cơ trong các mẫu nước. Thành phần các chất hữu cơ trong nước thải cao thì giá trị BOD cao và đơn vị tính là mg O₂/L.

Chỉ số COD (Chemical Oxygen Demand – nhu cầu oxygen hoá học) là lượng oxygen cần để oxi hoá bằng con đường hoá học các chất hữu cơ và vô cơ có trong nước.

Chỉ số TS (Total Solids – chất rắn tổng số) là toàn bộ lượng chất rắn gồm chất rắn hoà tan và chất rắn lơ lửng trong nước thải.

Chỉ số SS (Suspended Solids – chất rắn huyền phù) là lượng chất rắn kích thước nhỏ lơ lửng trong nước thải.

Bên cạnh đó, một số chỉ tiêu cơ bản khác của nước thải như màu sắc, độ cứng, độ đục, pH, mùi, chỉ tiêu vi sinh,... cũng được quan tâm.

Theo Luật Bảo vệ môi trường, các hệ thống quan trắc môi trường tự động hoặc bán tự động phải được lắp đặt tại các hệ thống xử lý nước thải tại các nhà máy và truyền số liệu đến Sở Tài nguyên và Môi trường giúp đánh giá và quản lý chất lượng nước thải từ sản xuất thông qua các thông số trên trước khi xả thải ra các hệ thống thoát nước chung.



- Công nghệ vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm môi trường là ngành khoa học nghiên cứu các quy trình kĩ thuật sử dụng tế bào vi sinh vật hoặc sản phẩm trao đổi chất của chúng để phân giải, biến đổi các chất gây ô nhiễm, góp phần làm sạch môi trường.
- Phục hồi sinh học là một phương pháp xử lý ô nhiễm môi trường đất, nước và không khí nhờ vi sinh vật. Tốc độ phân giải các chất ô nhiễm được tăng lên nhờ quá trình kích thích sinh học hoặc tăng cường sinh học.
- Đất, nước ngầm ô nhiễm bởi các nguyên nhân khác nhau như kim loại nặng, thuốc trừ sâu, dầu mỏ,... được xử lý bằng phương pháp phục hồi sinh học.
- Nước thải từ sinh hoạt, dịch vụ, công nghiệp,... được xử lý bằng cách kết hợp các quá trình vật lí, hoá học và sinh học thông qua ba giai đoạn gồm bậc một, bậc hai và bậc ba.

Bài 13 CÔNG NGHỆ ỨNG DỤNG VI SINH VẬT TRONG THU HỒI KHÍ SINH HỌC VÀ XỬ LÝ CHẤT THẢI RẮN

Học xong bài học này, em có thể:

Trình bày và giải thích được một số công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm môi trường:

- Thu hồi khí sinh học;
- Xử lý rác thải rắn.



Tại Việt Nam, ở một số vùng nông thôn xây dựng mô hình chăn nuôi (lợn, bò) có hệ thống xử lý chất thải áp dụng công nghệ vi sinh vật giúp giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường, đồng thời cung cấp năng lượng khí đốt. Đây là dẫn chứng thuyết phục về hiệu quả to lớn của việc áp dụng quá trình phân giải kỵ khí nhờ vi sinh vật để biến chất thải của con người, động vật; phế phẩm, phụ phẩm nông nghiệp, công nghiệp,... thành khí sinh học (biogas). Vậy các quy trình đó được thiết kế và sử dụng như thế nào?

I. CÔNG NGHỆ THU HỒI KHÍ SINH HỌC

1. Khí sinh học

Khí sinh học đã và đang được sử dụng ở nhiều quốc gia để cung cấp năng lượng như khí đốt, điện sinh hoạt cho người dân ở ngoại ô của các thành phố lớn và vùng nông thôn (hình 13.2). Cùng với năng lượng mặt trời và khí hydrogen, khí sinh học được coi là nguồn năng lượng tái sinh.

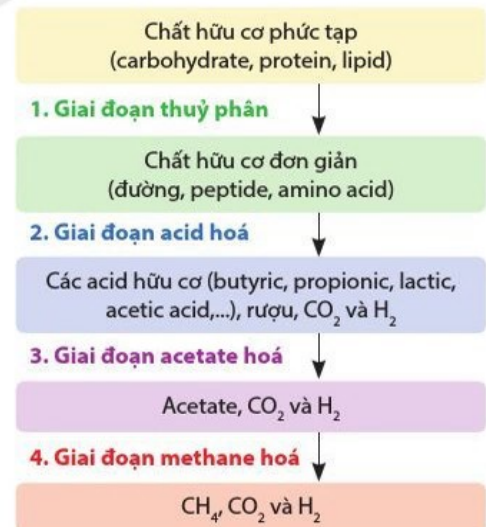
Khí sinh học là hỗn hợp khí gồm 55 – 65 % methane (CH_4), 35 – 45 % carbon dioxide (CO_2) và 1 – 3 % các khí khác (H_2S , NH_3 , H_2), được sinh ra từ quá trình phân giải kỵ khí các hợp chất hữu cơ nhờ các nhóm vi sinh vật khác nhau. Quá trình này được gọi là lên men methane, chia thành bốn giai đoạn (hình 13.3). Vi sinh vật tham gia trong mỗi giai đoạn lên men methane là tổ hợp các vi khuẩn khác nhau.



Hình 13.1. Hầm biogas xử lý chất thải tại một mô hình chăn nuôi ở Cư Jút, Đắk Nông



Hình 13.2. Nhà máy sản xuất khí sinh học để phát điện ở Bremen, Đức



Hình 13.3. Các giai đoạn của quá trình lên men methane



Hãy cho biết các nguyên liệu có thể sử dụng để lên men tạo khí sinh học.

2. Các nguồn nguyên liệu được sử dụng để thu hồi khí sinh học bằng công nghệ lên men methane

Các nghiên cứu thành phần hoá học tế bào và hoạt động sinh lí của tế bào vi sinh vật cho thấy nhu cầu đồng hoá carbon so với nitrogen của vi sinh vật gấp khoảng 20 – 30 lần. Các nguồn nguyên liệu được sử dụng để sản xuất khí sinh học rất đa dạng và phong phú bao gồm:

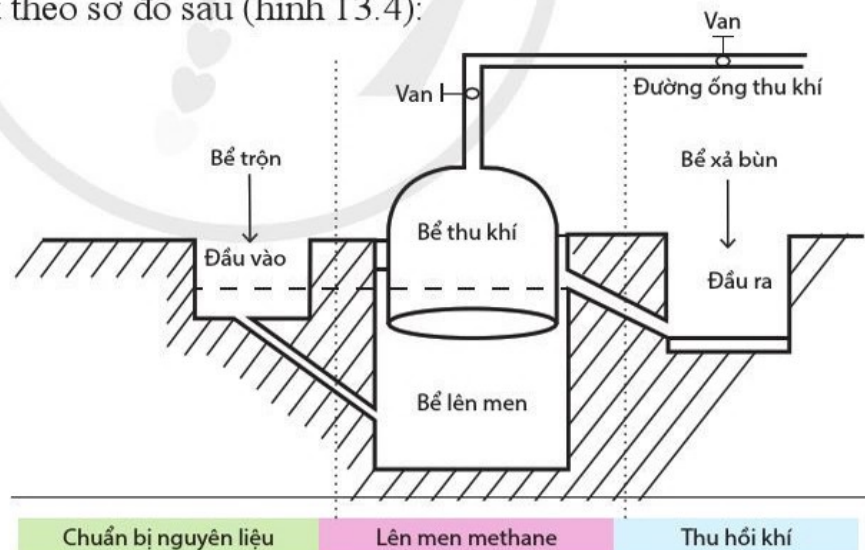
- Các loại bùn từ ao tù, đầm lầy, cống rãnh, bùn trong xử lí nước thải bậc một và bậc hai. Đây là nguyên liệu sản xuất khí sinh học khá phù hợp, đặc biệt, bùn từ quá trình xử lí nước thải có hàm lượng protein cao do 60 – 70 % là sinh khối vi khuẩn cùng các vitamin và khoáng chất.
- Các loại phân hữu cơ: các loại phân gia súc, gia cầm,... Các loại phân gia súc có tỉ lệ C/N rất phù hợp để lên men methane thu khí sinh học. Các loại phân khác nếu sử dụng cần phải được phối trộn thêm các thành phần khác để đảm bảo tỉ lệ C/N phù hợp.
- Các loại nước thải từ chăn nuôi, cơ sở chế biến thực phẩm và các ngành công nghiệp khác không có độc tố ức chế hoạt động của các vi sinh vật.
- Các loại phế phẩm, phụ phẩm từ nông nghiệp như rơm rạ, thân cây ngô, đậu, mùn cưa, trấu, vỏ cà phê,... Các phế phẩm, phụ phẩm này phổ biến, giàu cellulose nhưng thường nghèo nitrogen nên tỉ lệ C/N không phù hợp. Nguyên liệu này cần phải được làm nhỏ và phối trộn thêm các nguyên liệu giàu nitrogen khi tiến hành lên men methane.

3. Công nghệ sản xuất khí sinh học

Sản xuất khí sinh học từ bất kì nguồn nguyên liệu nào đều tiến hành qua các giai đoạn tương tự và có thể khái quát theo sơ đồ sau (hình 13.4):



1. Quan sát hình 13.4 và cho biết các giai đoạn của công nghệ lên men thu hồi khí sinh học. Vi sinh vật lên men sẽ được bổ sung vào bể nào?
2. Nêu các ứng dụng của khí sinh học.



Hình 13.4. Sơ đồ đơn giản các giai đoạn của công nghệ thu hồi khí sinh học

Hiện nay, công nghệ lên men thu hồi khí sinh học đã áp dụng ở quy mô các hộ gia đình, đặc biệt là tại các vùng nông thôn, nơi có nguồn nguyên liệu khá dồi dào. Hệ thống bể lên men có thể được làm từ gạch và vữa, bê tông, kim loại hoặc vật liệu tổng hợp (composite) với dung tích vài mét khối đến hàng chục mét khối. Công nghệ lên men thu hồi khí sinh học gồm ba giai đoạn:

- Giai đoạn chuẩn bị nguyên liệu: Các nguyên liệu cần nghiền nhỏ nếu kích thước lớn, phối chế với nguyên liệu khác để đảm bảo tỉ lệ C/N là 20 – 30 (lượng carbon gấp 20 – 30 lần lượng nitrogen theo nhu cầu đồng hoá của vi sinh vật). Nguyên liệu cần được trộn kỹ với nước, rồi đánh tơi. Nguyên liệu và giống vi sinh vật sau đó được nạp vào bể lên men. Giống vi sinh vật là tổ hợp các vi sinh vật như *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina*,... có trong bùn thải.
- Giai đoạn lên men methane: Có thể tiến hành theo mẻ, bán liên tục hoặc liên tục tùy thuộc vào thiết kế của hệ thống lên men. Thời gian lưu nguyên liệu phụ thuộc vào loại nguyên liệu (chất thải chăn nuôi 35 – 45 ngày; rơm rạ 80 – 100 ngày). Nhiệt độ của quá trình lên men có thể duy trì hai chế độ khoảng 30 – 35 °C hoặc 50 – 55 °C.
- Giai đoạn thu hồi khí: Khí được thu hồi thông qua hệ thống ống dẫn và van. Hỗn hợp khí cần được xử lý để tăng hàm lượng CH₄ và giảm mùi hôi.

Hiện nay, ở các trang trại chăn nuôi, nguồn chất thải phân trâu, bò hoặc lợn sau khi loại bỏ nước tiểu được phối trộn với rơm và bèo tây nghiền nhỏ theo tỉ lệ 3,1 : 3,2 : 4,3 (khối lượng tươi) để đảm bảo tỉ lệ C/N = 25 của nguyên liệu, rồi bổ sung nước. Sau đó, người ta bổ sung tổ hợp các vi sinh vật bằng cách sử dụng một phần bùn từ mẻ lên men trước hoặc bổ sung chế phẩm vi sinh (EM – effective microorganisms) cùng với nguyên liệu đưa vào bể để tiến hành lên men thu khí sinh học. Hiệu quả thu khí CH₄ có thể đạt 0,3 – 0,4 m³/m³ nguyên liệu/ngày.



Hãy nêu ít nhất ba lợi ích từ việc sản xuất khí sinh học đối với môi trường sinh thái và con người.

II. CÔNG NGHỆ ỨNG DỤNG VI SINH VẬT TRONG XỬ LÝ CHẤT THẢI RẮN

1. Đặc điểm của chất thải rắn

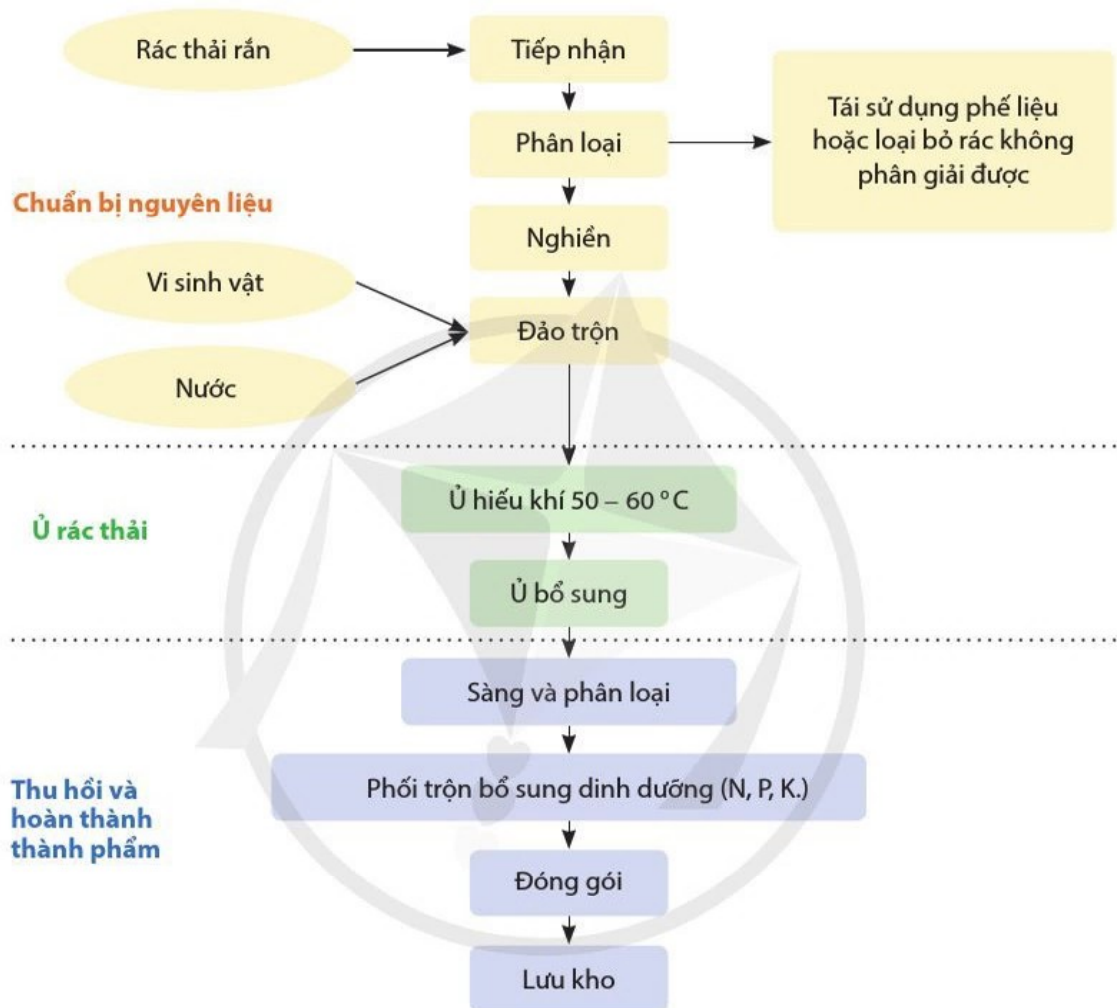
Chất thải rắn rất đa dạng về chủng loại bao gồm rác thải sinh hoạt, rác thải xây dựng và chất thải thông thường từ công nghiệp và nông nghiệp. Thành phần chất thải rắn gồm các chất hữu cơ, vô cơ và nhiều nhóm vi sinh vật như vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc, nấm men. Bên cạnh những vi sinh vật dị dưỡng, trong rác thải cũng xuất hiện các nhóm vi sinh vật hoá tự dưỡng. Các vi sinh vật tồn tại trong rác thải có thể là nhóm hiếu khí, kỵ khí hoặc kỵ khí tùy nghi. Các vi sinh vật đó được chia thành nhóm ưa ấm (25 – 35 °C), ưa nhiệt (50 – 55 °C) và chịu nhiệt (70 – 85 °C).

2. Công nghệ xử lý rác thải rắn nhờ công nghệ vi sinh

Hiện nay có nhiều phương pháp xử lý chất thải rắn gồm có chôn lấp, đốt, thải trực tiếp ra sông hồ và sử dụng công nghệ vi sinh vật. Các phương pháp chôn lấp, đốt, thải ra sông hồ là những phương pháp truyền thống nhưng lại là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường đất, nước và không khí khu vực xung quanh. Với sự xuất hiện của các nhóm vi sinh vật khác nhau trong rác thải rắn, công nghệ ứng dụng vi sinh vật được lựa chọn để xử lý rác thải bằng phương pháp ủ hiếu khí và ủ kỵ khí để tạo ra các sản phẩm phân bón cho cây trồng.

- Ủ hiếu khí là phương pháp mà trong đó rác thải rắn được tập hợp thành luống, đống hoặc đưa vào các bể ủ, có đảo trộn hoặc thổi khí để các nhóm vi sinh vật hiếu khí sinh trưởng.
- Ngược lại, trong phương pháp ủ kỵ khí rác thải được tập hợp thành đống, trát kín hoặc chôn lấp trong các hố sâu, nén chặt và phủ kín tạo điều kiện kỵ khí cho các nhóm vi sinh vật kỵ khí phát triển.

Dưới đây là quy trình công nghệ xử lý rác thải sinh hoạt sản xuất phân hữu cơ (phân compost) tại nhà máy hiện đang sử dụng.



Hình 13.5. Quy trình xử lý rác thải sinh hoạt bằng ủ hiếu khí tạo phân hữu cơ tại nhà máy

? Quan sát hình 13.5 và cho biết quy trình xử lý rác thải rắn thành phân hữu cơ gồm mấy giai đoạn. Ý nghĩa của mỗi giai đoạn này là gì?

Quy trình sản xuất phân hữu cơ (phân compost) được chia thành ba giai đoạn:

- Giai đoạn chuẩn bị nguyên liệu: Để xử lý hiệu quả, chất thải rắn cần được phân loại thành các nhóm rác vô cơ và rác hữu cơ. Một số loại rác vô cơ như kim loại, thủy tinh và một số loại rác hữu cơ như giấy, bia, chất dẻo, nhựa, gỗ được loại ra để tái chế, các loại rác vô cơ khác được loại bỏ và chôn lấp. Việc phân loại rác này có thể thực hiện từ nguồn, tức là tại hộ gia đình, cơ sở kinh doanh hoặc tại các nhà máy

thu gom rác thải. Trong thành phần rác hữu cơ cũng có một số thành phần khó phân giải như lignin, sừng, móng, tóc, vỏ trai, vỏ sò,... vì vậy cũng cần loại bỏ những thành phần này trong rác thải. Nguyên liệu rác hữu cơ sau đó được nghiền nhỏ, phối trộn với nguyên liệu khác để đảm bảo tỉ lệ C/N là 30 – 35 (lượng carbon gấp 30 – 35 lần lượng nitrogen theo nhu cầu đồng hoá của vi sinh vật), bổ sung nước, giống vi sinh vật, đảo trộn cho đồng đều về độ ẩm và vi sinh vật. Giống vi sinh vật gồm các nhóm vi sinh vật ưa ẩm, ưa nhiệt, chịu nhiệt, như *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Trichoderma*,... Độ ẩm của đồng ủ cần duy trì ở 45 – 50 %. Nguyên liệu được đánh luống cao khoảng 1,5 – 2,0 m hoặc chôn vào bể ủ có chiều cao khoảng 2,0 – 2,5 m để chuẩn bị cho giai đoạn xử lý tiếp theo.

- Giai đoạn ủ rác thải: Trong quá trình ủ, khí O_2 được cung cấp cho đồng ủ bằng hệ thống thổi khí và phân tán khí thiết kế phía dưới đồng ủ, phun nước nếu cần thiết. Thời gian ủ thường kéo dài khoảng 3 tuần, nhiệt độ đồng ủ tăng cao lên 50 – 60 °C. Sau khi nhiệt độ đồng ủ hạ xuống nhiệt độ bình thường, dỡ đồng ủ và đưa vào ủ bổ sung, thời gian kéo dài 2 tuần. Trong quá trình này, cần đảo trộn để cung cấp đủ oxygen cho vi sinh vật tồn tại trong đồng ủ.
- Giai đoạn thu hồi và hoàn thành thành phẩm: Phân sau ủ được sàng lọc để loại bỏ các vật có kích thước lớn, không phân giải trong quá trình ủ. Sau đó, các chất phụ gia, thành phần N, P, K, vi lượng được trộn bổ sung. Thành phẩm được đóng gói và bảo quản trong kho.



1. Bên cạnh sản phẩm phân hữu cơ, hãy nêu một sản phẩm khác có thể sản xuất từ rác thải rắn hữu cơ nhờ vi sinh vật kỵ khí.
2. Hãy thiết lập các bước của quy trình đơn giản xử lý rác thải hữu cơ thành phân bón hữu cơ tại hộ gia đình.



- Công nghệ sản xuất khí sinh học là ứng dụng quá trình lên men methane nhờ các nhóm vi sinh vật kỵ khí phân giải các chất thải hữu cơ; phế phẩm, phụ phẩm của nông nghiệp; công nghiệp;... để tạo tổ hợp khí CH_4 và CO_2 cung cấp năng lượng khí đốt, chạy động cơ, phát điện. Quy trình này gồm ba giai đoạn: chuẩn bị nguyên liệu, lên men methane và thu hồi khí sinh học.
- Ủ phân hữu cơ trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí là một trong những phương pháp xử lý rác thải rắn nhờ vi sinh vật để tạo ra sản phẩm phân bón. Quy trình sản xuất phân hữu cơ gồm ba giai đoạn: chuẩn bị nguyên liệu; ủ rác thải; thu hồi và hoàn thành sản phẩm.

Bài 14 DỰ ÁN ĐIỀU TRA CÔNG NGHỆ ỨNG DỤNG VI SINH VẬT TRONG XỬ LÝ RÁC THẢI HOẶC NƯỚC THẢI

Học xong bài học này, em có thể:

- Xác định được vấn đề nghiên cứu, lập kế hoạch thực hiện, tiến hành, tổng kết, viết và trình bày báo cáo kết quả nghiên cứu.
- Thực hiện được dự án "Điều tra công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong xử lý rác thải hoặc nước thải tại địa phương".

Để thực hiện dự án "Điều tra công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong xử lý rác thải hoặc nước thải tại địa phương" cần tìm hiểu các nội dung sau:

1. Mục tiêu

- Thực hiện được bốn bước của dự án nghiên cứu gồm: xác định mục tiêu và nội dung nghiên cứu; lập kế hoạch thực hiện; thực hiện và báo cáo kết quả.
- Tìm hiểu được thông tin về công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong xử lý rác thải hoặc nước thải ở địa phương em sinh sống.

2. Nội dung điều tra

Tìm hiểu về các loại rác thải hay nước thải và mô tả công nghệ ứng dụng vi sinh vật xử lý rác thải hoặc nước thải tại các địa điểm khác nhau ở địa phương như:

- Nhà máy xử lý rác thải hoặc nước thải của địa phương.
- Các khu công nghiệp của địa phương.
- Các nhà máy chế biến thực phẩm của địa phương.

3. Chuẩn bị

- Sổ và bút ghi chép.
- Thiết bị chụp ảnh.

4. Tiến hành

- Lớp được chia thành các nhóm, 4 – 5 học sinh/nhóm. Học sinh làm việc nhóm kết hợp làm việc độc lập.
- Các nhóm thực hiện các bước sau:

Bước 1: Xác định vấn đề nghiên cứu gồm:

- Lí do: Điều tra vấn đề gì? Tại sao cần phải thực hiện điều tra?
- Mục tiêu: Đạt được điều gì sau khi thực hiện dự án điều tra?
- Các nội dung: Các nội dung nào cần thực hiện để đạt mục tiêu?
- Địa điểm điều tra.
- Phương pháp thực hiện: Thực hiện các nội dung đó như thế nào?

Bước 2: Xây dựng kế hoạch thực hiện gồm các nội dung thực hiện, thời gian, phân công nhiệm vụ cho mỗi thành viên của nhóm và dự kiến kết quả.

Các nhóm có thể tham khảo mẫu đề cương dưới để hoàn thành hai bước đầu tiên khi thực hiện dự án và sử dụng một phần nội dung này (tên dự án, lí do thực hiện, mục tiêu, địa điểm điều tra, phương pháp thực hiện) cho báo cáo kết quả.

Mẫu đề cương

- Tên dự án:
- Tên các thành viên của nhóm:
- Lí do thực hiện dự án:
- Mục tiêu của dự án:
- Địa điểm điều tra:
- Phương pháp thực hiện:
- Kế hoạch thực hiện:

TT	Nội dung thực hiện	Thời gian	Người thực hiện	Dự kiến kết quả
1	Tìm hiểu về loại rác thải hoặc nước thải	... giờ, ngày ... tháng ... năm ... Địa điểm:	Nguyễn Văn A: chụp ảnh Phạm Thị B: ghi chép Trần Thị C: phỏng vấn	Tìm hiểu được đặc điểm của các loại rác thải hoặc nước thải
2	Tìm hiểu về công nghệ ứng dụng vi sinh vật trong xử lí rác thải hoặc nước thải	?	?	?
3	Viết báo cáo và báo cáo kết quả	?	?	?

Bước 3: Thực hiện theo kế hoạch đã xây dựng và phân công.

Bước 4: Tổng kết và báo cáo kết quả điều tra.

5. Báo cáo kết quả

- Nội dung báo cáo gồm các phần:
 - Tên dự án
 - Tên các thành viên thực hiện
 - Lí do thực hiện
 - Mục tiêu
 - Địa điểm điều tra
 - Phương pháp thực hiện
 - Các kết quả đạt được
 - Phân tích kết quả và đưa ra kết luận
- Trình bày báo cáo kết quả trước lớp và thảo luận chung.

Ghi chú

Trong quá trình thực hiện dự án cần lưu ý:

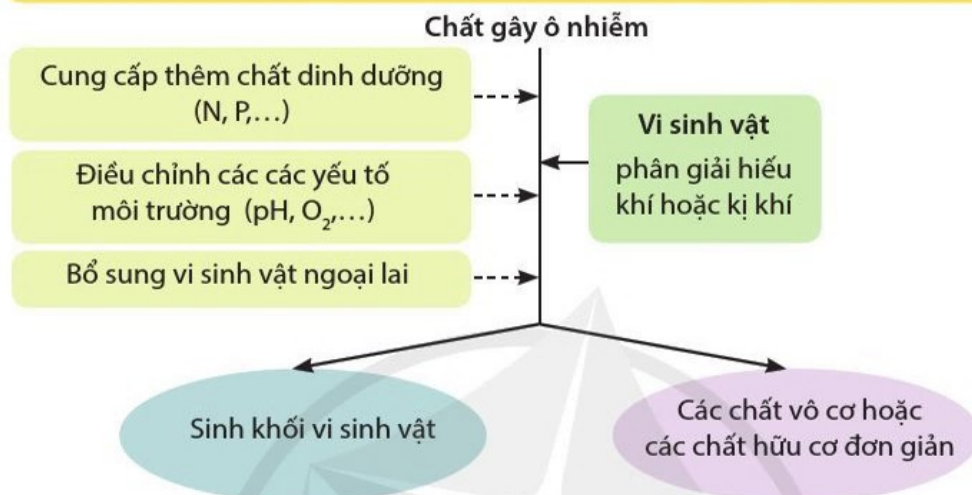
- Có sổ nhật kí để ghi chép, lưu giữ một cách hệ thống tất cả biên bản họp nhóm, những thông tin thu được trong suốt quá trình thực hiện dự án.
- Tuân thủ các quy tắc an toàn.
- Có ý thức hợp tác thực hiện dự án.
- Biết rút kinh nghiệm để cải tiến phương pháp thực hiện nhiệm vụ được phân công.

ÔN TẬP CHUYÊN ĐỀ 3

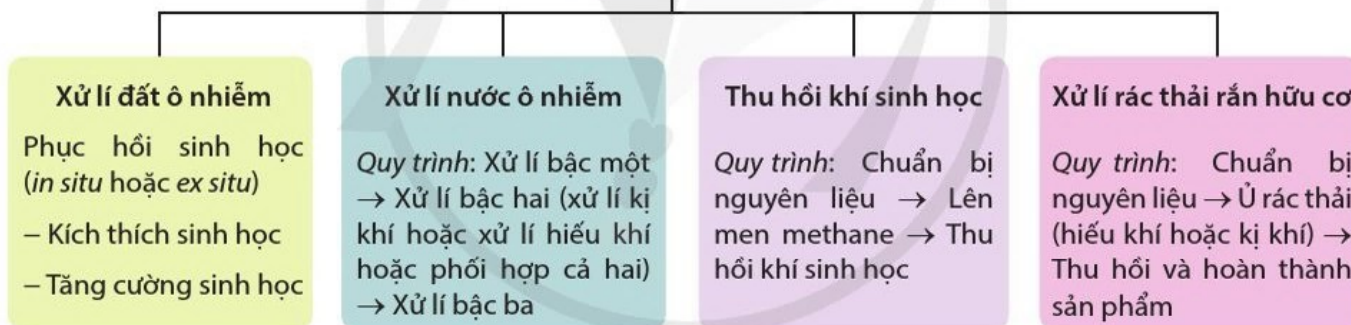
CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT TRONG XỬ LÝ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG

I. TÓM TẮT NỘI DUNG

VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT VÀ QUÁ TRÌNH PHÂN GIẢI CÁC HỢP CHẤT TRONG XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG



ỨNG DỤNG VI SINH VẬT TRONG XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG



Xử lý đất ô nhiễm

Phục hồi sinh học (*in situ* hoặc *ex situ*)

- Kích thích sinh học
- Tăng cường sinh học

Xử lý nước ô nhiễm

Quy trình: Xử lý bậc một → Xử lý bậc hai (xử lý kỵ khí hoặc xử lý hiếu khí hoặc phối hợp cả hai) → Xử lý bậc ba

Thu hồi khí sinh học

Quy trình: Chuẩn bị nguyên liệu → Lên men methane → Thu hồi khí sinh học

Xử lý rác thải rắn hữu cơ

Quy trình: Chuẩn bị nguyên liệu → Ủ rác thải (hiếu khí hoặc kỵ khí) → Thu hồi và hoàn thành sản phẩm

II. CÂU HỎI

1. Cho biết vai trò vi sinh vật trong xử lý các hợp chất gây ô nhiễm môi trường.
2. Phục hồi sinh học là gì? Có những loại phục hồi sinh học nào? Nêu ứng dụng phục hồi sinh học trong xử lý ô nhiễm đất, nước.
3. Nêu và giải thích quy trình công nghệ sử dụng vi sinh vật trong xử lý nước thải.
4. Nêu và giải thích quy trình công nghệ sử dụng vi sinh vật trong thu hồi khí sinh học.
5. Nêu và giải thích quy trình công nghệ sử dụng vi sinh vật trong xử lý rác thải rắn hữu cơ.

BẢNG GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

	Giải thích thuật ngữ	Trang
biểu hiện gene	quá trình sinh tổng hợp protein từ gene mã hoá protein đó trong tế bào	57
bùn hoạt tính	chất rắn chứa sinh khối vi sinh vật và các chất hữu cơ tạo ra trong quá trình xử lý hiếu khí nước thải	78
cắt giới hạn	phản ứng cắt phân tử DNA có sự tham gia của enzyme giới hạn	57
cấy chuyển	quá trình chuyển một phần dịch nuôi tế bào sang môi trường nuôi cấy mới	19
chất chuyển hoá thứ cấp	các chất hữu cơ tự nhiên được tổng hợp chủ yếu ở thực vật, nấm và vi khuẩn; có khối lượng phân tử nhỏ; thường có hoạt tính sinh học; không phải là các chất thiết yếu cho sự sinh trưởng, phát triển và sinh sản bình thường của cơ thể	6
chất phụ gia	một số chất (đường, polysaccharide hoặc các chất tương thích khác) được bổ sung vào chế phẩm enzyme để bảo quản enzyme	45
chế phẩm enzyme	sản phẩm chứa enzyme có hoạt tính được phối hợp với các chất phụ gia để bảo quản enzyme	45
công nghệ enzyme	ngành công nghệ sản xuất các chế phẩm enzyme và ứng dụng chúng trong các lĩnh vực khác nhau	45
DNA tái tổ hợp	phân tử DNA có từ hai nguồn gốc trở lên, một là từ vector chuyển gene (thể truyền) và phần còn lại là từ DNA của các sinh vật có gene mã hoá protein đích	8
enzyme cố định (enzyme không tan)	chế phẩm enzyme, trong đó enzyme được giữ hoặc gắn trong một vùng, một khoang cố định của giá thể hay chất mang	66
enzyme tái tổ hợp	enzyme được sinh tổng hợp từ phân tử DNA tái tổ hợp trong tế bào sinh vật chủ	48
enzyme trong tế bào	chế phẩm enzyme, trong đó enzyme được giữ bên trong tế bào sinh vật sống trong suốt quá trình xúc tác phản ứng	60
enzyme tự do (enzyme tan)	chế phẩm enzyme, trong đó enzyme được trộn với các chất phụ gia hoặc hoà tan trong dung dịch bảo quản, tự do di chuyển, tiếp xúc với cơ chất khi tham gia xúc tác	60
enzyme tự nhiên	enzyme được chiết xuất từ các sinh vật trong tự nhiên	67
<i>ex vivo</i>	ngoại cảnh (ngoài cơ thể)	21
hạt nhân tạo	hạt tổng hợp, là phôi soma hoặc mô sinh dưỡng của cây (chồi) được bao bọc và bảo quản ở trạng thái ngủ nghỉ và có thể được nuôi cấy <i>in vitro</i> tạo cây hoàn chỉnh	13
hoạt độ của enzyme	lượng enzyme cần thiết để chuyển hoá một lượng cơ chất đặc hiệu thành sản phẩm trong một đơn vị thời gian và ở điều kiện phản ứng xác định	46
hoạt độ riêng của enzyme	hoạt độ của enzyme trong một đơn vị khối lượng tính bằng miligam hoặc gam chế phẩm protein enzyme	46
huyền phù tế bào	hỗn hợp các tế bào tách rời hoặc cụm tế bào nhỏ trong môi trường nuôi cấy dạng lỏng	12

in sinh học (bioprinting)	ứng dụng kĩ thuật số in 3D và kĩ thuật giống như in 3D kết hợp các tế bào, yếu tố sinh trưởng và vật liệu sinh học khác để chế tạo các mô và cơ quan, mô phỏng chính xác các đặc điểm của mô tự nhiên từ vật liệu có sẵn	10
kháng thể đơn dòng	các phân tử protein globulin miễn dịch giống nhau được tạo bởi một dòng tế bào B, nhận biết một vị trí liên kết kháng nguyên (epitope) duy nhất	8
khí sinh học	hỗn hợp khí methane, carbon dioxide và những khí khác sinh ra từ quá trình phân giải các chất hữu cơ nhờ vi sinh vật	81
màng bám sinh học	các vi sinh vật phát triển, kết dính với nhau thành đám trên bề mặt cứng	79
mô sẹo (callus, ở thực vật)	khối các tế bào "không có tổ chức", không biệt hoá, có tiềm năng đạt được tính toàn năng	7
nuôi cấy đơn lớp	kiểu nuôi cấy (tế bào động vật) trong đó các tế bào sinh trưởng hình thành một lớp tế bào dính bám trên đĩa hoặc bình nuôi cấy	31
nuôi cấy <i>in vitro</i>	mô tế bào được sinh trưởng và phát triển nhờ môi trường dinh dưỡng trong phòng thí nghiệm	12
nuôi cấy sơ cấp	giai đoạn nuôi cấy khởi đầu từ mẫu vật liệu nuôi cấy là mảnh cắt mô hoặc cơ quan	29
nuôi cấy thứ cấp	quá trình nuôi cấy mô tế bào sau cấy chuyển lần đầu tiên và lặp lại nhiều lần cấy chuyển	29
phân giải hiếu khí	quá trình phân giải sinh học xảy ra trong điều kiện có oxygen	68
phân giải kỵ khí	quá trình phân giải sinh học xảy ra trong điều kiện không có oxygen	68
phôi soma	phôi được hình thành từ các tế bào soma (tế bào sinh dưỡng) của cơ thể (thường ở thực vật)	7
phục hồi sinh học chuyển vị (<i>ex situ</i>)	quá trình phục hồi sinh học được tiến hành tại chỗ khác không phải nơi xảy ra ô nhiễm	73
phục hồi sinh học nguyên vị (<i>in situ</i>)	quá trình phục hồi sinh học được tiến hành tại nơi xảy ra ô nhiễm	73
sắc kí	phương pháp phân tách các phân tử khác nhau trong một hỗn hợp dựa trên kích thước của các phân tử hoặc các liên kết (trao đổi ion, kỵ nước, ái lực,...) giữa phân tử cần phân tách với các nhóm chức trên chất mang	54
syrup HFCS	hỗn hợp của glucose và fructose được chế biến từ tinh bột ngô	61
tái sinh	quá trình thay thế hoặc khôi phục lại các tế bào, mô, cơ quan hoặc toàn bộ cơ thể từ một phần của cơ thể sống	6
tế bào gốc	tế bào chưa biệt hoá, có khả năng tái tạo và biệt hoá hình thành các mô, cơ quan hoặc toàn bộ cơ thể hoàn chỉnh	6
tế bào gốc đa năng (multipotent)	tế bào có khả năng biệt hoá thành một số loại tế bào nhất định, tùy vị trí mà chúng bắt nguồn	38

tế bào gốc phôi	tế bào gốc bắt nguồn từ khối tế bào bên trong của phôi nang, có khả năng được biệt hoá thành hầu hết các loại mô và cơ quan của cơ thể	18
tế bào gốc toàn năng (totipotent)	tế bào có khả năng phân chia để tái tạo và biệt hoá, phát triển thành bất kì loại tế bào nào trong cơ thể	38
tế bào gốc trưởng thành	tế bào chưa được biệt hoá, có ở một số vị trí nhất định trong các mô hoặc cơ quan của cơ thể	37
tế bào gốc ung thư	loại tế bào ung thư có khả năng tự tái tạo, biệt hoá tạo ra các thể hệ tế bào con phát triển thành khối u giống khối u ban đầu khi đưa vào cơ thể không có khối u	38
tế bào gốc vạn năng (pluripotent)	tế bào gốc có khả năng biệt hoá thành một trong hàng trăm loại tế bào của cơ thể trưởng thành dưới những điều kiện đặc thù	38
tế bào gốc vạn năng cảm ứng	tế bào gốc hình thành từ các tế bào soma trưởng thành nhờ chuyển một số gene có chức năng gây phân biệt hoá (tái lập trình)	9
tế bào trần	tế bào thực vật đã bị loại bỏ thành (vách) tế bào, chỉ còn màng sinh chất bao quanh tế bào chất	7
 tinh sạch enzyme	làm sạch enzyme khỏi các chất khác trong chế phẩm enzyme thô, tạo chế phẩm enzyme thương phẩm	51
trích li enzyme	chiết hoặc tách enzyme ra khỏi nguyên liệu ban đầu để tạo chế phẩm enzyme thô, làm nguyên liệu cho các bước tinh sạch sau	51
vector (thể truyền)	phân tử DNA có khả năng mang đoạn gene đích vào tế bào chủ	57
vi nhân giống	quá trình nhân giống hoặc tái sinh cây trồng từ mô tế bào thực vật trong điều kiện môi trường nuôi cấy <i>in vitro</i> , để tạo ra số lượng lớn cây trồng mới	6
vi sinh vật bản địa	các vi sinh vật có nguồn gốc tại địa phương	75
vi sinh vật ngoại lai	các vi sinh vật có nguồn gốc từ nơi khác hoặc được chuyển gene	73

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

Địa chỉ: Tầng 6, Tòa nhà số 128 đường Xuân Thủy, quận Cầu Giấy, TP. Hà Nội

Điện thoại: 024.37547735

Email: nxb@hnue.edu.vn | **Website:** www.nxbdhsp.edu.vn

Chịu trách nhiệm xuất bản:

Giám đốc: NGUYỄN BÁ CƯỜNG

Chịu trách nhiệm nội dung:

Tổng biên tập: ĐỖ VIỆT HÙNG

Chịu trách nhiệm tổ chức bản thảo và bản quyền nội dung:

CÔNG TY CỔ PHẦN ĐẦU TƯ XUẤT BẢN – THIẾT BỊ GIÁO DỤC VIỆT NAM

Chủ tịch Hội đồng Quản trị kiêm Tổng Giám đốc: NGUYỄN NGÔ TRẦN ÁI

Biên tập:

ĐỖ THỊ HỒNG – NGUYỄN THỊ HƯƠNG THẢO

Thiết kế sách và minh họa:

NGUYỄN THỊ THU HÀ – PHAN THỊ LƯƠNG

Trình bày bìa:

NGUYỄN THỊ THU HÀ

Sửa bản in:

NGUYỄN KIM DUNG

Trong sách có sử dụng tư liệu, hình ảnh của một số đồng nghiệp. Trân trọng cảm ơn.

CHUYÊN ĐỀ HỌC TẬP SINH HỌC 10

Mã số:

ISBN: 978-604-.....-.....-.....

In cuốn, khổ 19 x 26,5 cm, tại

Địa chỉ:

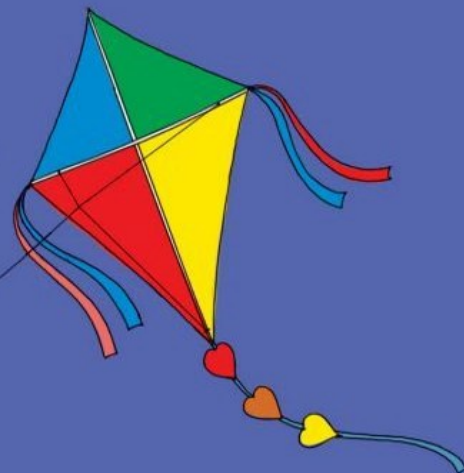
Cơ sở in:

Số xác nhận đăng ký xuất bản:/CXBIPH/...../ĐHSP

Quyết định xuất bản số:/QĐ-NXBĐHSP ngày/...../.....

In xong và nộp lưu chiểu năm

Mang cuộc sống vào bài học Đưa bài học vào cuộc sống



*S*ách Chuyên đề học tập Sinh học 10, thuộc bộ sách giáo khoa Cánh Diều, được biên soạn theo Chương trình giáo dục phổ thông 2018.

Sách được biên soạn nhằm đáp ứng yêu cầu phát triển phẩm chất và năng lực của học sinh. Sách đem đến cho các em học sinh những kiến thức cập nhật về công nghệ sinh học. Những bài học sinh động với phương pháp học tập tích cực sẽ giúp các em tìm hiểu, khám phá thế giới sống và vận dụng kiến thức vào giải quyết những vấn đề của thực tiễn.

Sách được tập thể các nhà khoa học, nhà giáo giàu kinh nghiệm và tâm huyết về giáo dục phổ thông biên soạn một cách công phu. Cùng với sự hỗ trợ của sách giáo khoa điện tử, sách sẽ giúp cho quá trình học tập của các em thêm dễ dàng và hấp dẫn.



1. Quét mã QR hoặc dùng trình duyệt web để truy cập website bộ sách Cánh Diều: www.hoc10.com.
2. Vào mục Hướng dẫn (www.hoc10.com/huong-dan) để kiểm tra sách giả và xem hướng dẫn kích hoạt sử dụng học liệu điện tử.

SÁCH KHÔNG BÁN